ISSN 0022-4847

台灣農業研究

第五十八卷　　第三期

研究報告

水稻抗白葉枯病基因之密碼子使用偏性
魏夢麗、鍾依涵、呂椿棠、呂秀英 155

分析植體氮同位素組成鑑別有機蔬菜之初步評估
劉滄棽、彭宗仁、吳昇鴻、范家華、林毓雯 169

甜瓜白粉病菌之繁殖、接種及保存
黃晉興、陳純葳、蘇俊峰 176

利用中和後之亞磷酸溶液防治馬鈴薯與番茄晚疫病
蔡志濃、安寶貞、王姻婷、王馨媛、胡瓊月 185

感染洋桔梗之番椒葉脈斑駁病毒之分離與鑑定
鄭櫻慧、陳金枝、廖吉彥、鄧汀欽、張清安 196

荔枝新品種台農 3 號玫瑰紅之育成
張哲瑋、顏昌瑞、徐信次、王婉伶、蔡武雄、程永雄、何昭吉 208

栽培稻 (*Oryza sativa*) 與野生稻 (*O. australiensis*) 導入系統之建立及其產量相關性狀之表現
李長沛、古新梅、胡澤寬、陳治官、賴明信、曾清山、陳哲仁、曾東海 219

研究簡報

ABA、Fluridone 及 Sucrose 對鐵炮型及群間雜交種百合鱗片葉發育形態影響之研究
戴廷恩、許圳塗 234

中華民國九十八年九月

行政院農業委員會農業試驗所出版

中華民國　台灣　台中縣　霧峰鄉

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 58(3):155–168 (2009)

水稻抗白葉枯病基因之密碼子使用偏性[1]

魏夢麗[2] 鍾依涵[2] 呂椿棠[2] 呂秀英[3,4]

摘　　要

魏夢麗、鍾依涵、呂椿棠、呂秀英。2009。水稻抗白葉枯病基因之密碼子使用偏性。台灣農業研究 58:155–168。

密碼子使用偏性分析對水稻白葉枯病抗病基因 (*Xa*) 之抗性分子機制之瞭解相當重要，因此本研究自 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 公共資料庫下載已完全定序的 *Xa* 基因 (*Xa1, xa5, xa13, Xa13, Xa21, Xa26* 及 *Xa27*) 及其家族之 17 個編碼區序列 (coding domain sequence, CDS) 進行密碼子使用偏性分析。首先進行各 *Xa* 基因之同義密碼子相對使用度 (relative synonymous codon usage, RSCU) 的集群分析和對應分析，可將 *Xa* 基因之 CDS 明顯區分成 4 群。進而再分別計算各群基因之同義密碼子相對使用頻率 (relative frequency of synonymous codon, RFSC) 以篩選出高頻密碼子，結果發現蛋白質序列具有多白胺酸重複 (leucine-rich repeat, LRR) 區域結構且 CDS 長度大於 1000 bp 的 *Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26*，其大多數胺基酸並無密碼子使用偏好性，僅少數胺基酸偏好以 A 或 U 結尾的同義密碼子；而不具 LRR 區域蛋白質結構且 CDS 長度較短的 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27*，則幾乎所有胺基酸都偏好以 C 或 G 結尾的同義密碼子。*Xa1*、*Xa21*、*Xa26* 及 *Xa27* 的表現蛋白質皆含豐富之白胺酸 (leucine, Leu)，但 *Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 的 Leu 並無偏好任何密碼子，亦即其表現蛋白質的 Leu 可選擇任意同義密碼子轉譯，而 *Xa27* 的 Leu 則高度偏好使用 CUC。由此顯見，同樣對白葉枯病菌產生抗性的不同 *Xa* 基因間，呈現出密碼子使用偏性的多樣性。

關鍵詞： *Xa* 基因、同義密碼子相對使用度、同義密碼子相對使用頻率、集群分析、對應分析。

前　　言

遺傳訊息由 DNA 經 RNA 再到蛋白質的遺傳過程是生物學中心法則，其中由 A、T (U)、C、G 四種核苷酸以 3 個為一組排列組合而成 1 個胺基酸，即所謂遺傳密碼子 (codon)，共有 64 種組合 ($4^3 = 64$)，但合成細胞中蛋白質的胺基酸只有 20 種，因此有 2 個或 2 個以上轉譯成

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2361 號。接受日期：98 年 7 月 17 日。
2. 本所作物組助理研究員、計畫助理、助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 本所技術服務組研究員兼組長。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件：iying@ tari.gov.tw；傳真機：(04)23325176。

同一胺基酸之情形，此現象稱為密碼子的簡併性 (degeneracy)，這些表現相同胺基酸的密碼子稱為同義密碼子 (synonymous codon)。大多數生物體或基因通常傾向使用部份特定的同義密碼子，這些同義密碼子稱為該生物體或基因的最優密碼子 (optimal codon)，此現象稱為密碼子使用偏性 (codon usage bias)。密碼子使用偏性會因物種或基因不同而有所差異 (Gu *et al*. 2002; Fan *et al*. 2003)。

蛋白質高級結構由其一級結構 (胺基酸序列) 所決定，即蛋白質摺疊及天然結構所需要之訊息皆蘊含在一級胺基酸序列中，即 Anfinsen 原理 (Anfinsen 1973)。幾乎所有的蛋白質結構預測方法，無論其具體手段如何，事實上都以此為基礎，但多年來利用一級結構來預測高級結構，不斷改進預測方法但成效並不顯著，因此找尋影響蛋白質摺疊於胺基酸序列之外的訊息則更為重要；而基因的編碼區序列 (coding domain sequence, CDS) 可能攜有相關訊息，由於遺傳密碼的簡併性，基因序列較其編碼之胺基酸序列有更多的訊息 (Li & Song 2003)。密碼子是胺基酸的精細結構，蛋白質在核糖體上的合成過程中，由於密碼子和反密碼子 (anticodon) 之特性以及細胞環境之不同，造成同義密碼子轉譯成胺基酸的過程發生差異，這些差異會影響新胜肽鏈摺疊的動力學過程，進而可能影響到蛋白質的最終空間結構，因此研究基因之胺基酸組成與密碼子使用偏性，有利蛋白質高級結構之預測 (Gu *et al*. 2002; Hu & Lin 2005)。

造成同義密碼子使用性 (synonymous codon usage) 之因素多而複雜，其中包含有：鹼基組成突變偏性 (base compositional mutation bias, Karlin & Mrazek 1996; Knight *et al*. 2001; Huo & Yang 2003)、自然選擇 (nature selection, Sharp & Li 1986; Duret & Mouchiroud 1999; Peixoto *et al*. 2003; Romero *et al*. 2003)、基因長度 (Moriyama & Powell 1998)、tRNA 豐富度 (Percudani *et al*. 1997; Duret 2000)、mRNA 二級結構 (Gu *et al*. 2004)、密碼子與反密碼子之交互作用 (Shi *et al*. 2001)、蛋白質結構 (Gupta *et al*. 2000)、蛋白質親水程度及胺基酸保守性 (Romero *et al*. 2000)、轉譯起點效應 (Stenström *et al*. 2001) 等。然而，主要造成密碼子使用偏性的因素為組成突變偏性及自然選擇，而不同的物種也會有不同的影響因素 (Berezhnoy & Duplij 2005; Liu & Xue 2005)。Sharp *et al*. (1994) 把密碼子使用偏好性強和弱兩組基因之間同義密碼子相對使用度之差，達到統計學上顯著水準的密碼子定義為最優密碼子，提供了高度表達基因一個表示依據。Duret *et al*. (1999) 則認為，所謂最優密碼子只是隨著基因表達程度的升高而增加其出現頻率的密碼子。一般認為高表達基因的密碼子偏好程度遠大於低表達的基因，這可能是使用主要偏愛密碼子有優化轉譯的效應 (Sharp *et al*. 1993)。密碼子使用偏性上的差異，與蛋白質轉譯速度快慢有關 (Duret & Mouchiroud 1999)。而不同功能的基因，其密碼子使用偏性也存在較大的差異 (Liu *et al*. 2005)。因此，探討基因密碼子使用偏性與基因表達之間的關連，可了解基因在調控表達中對遺傳密碼的選擇性及細胞內蛋白質的轉譯速度，對基因演化規律、轉譯調控機制研究具有重要性。此外，密碼子使用偏性的分析，也能輔助編碼區鑑定、基因選殖體寡核苷酸探針之製備、基因晶片設計等 (Ma *et al*. 2002; Dos *et al*. 2003)。

同義密碼子相對使用度 (relative synonymous codon usage, RSCU) 是常用的同義密碼子使用性之統計評估指標，用以檢測轉譯成同一胺基酸之同義密碼子的出現頻率是否相等：當 RSCU 值大於 1 時表示相對應的密碼子出現的次數比期望次數高，反之則表示出現次數相對較少 (Sharp *et al*. 1986)。利用 RSCU

之計算，可將資料集內的密碼子使用予以常態化，使不受胺基酸組成差異之影響 (Comeron & Aguade 1998)。而 Lin *et al*. (2002) 利用菸草具有高度表達基因的特性，提出了高頻密碼子 (high-frequency codon) 的判定方法，即利用某一密碼子在基因序列中之實際觀測數與該密碼子對應之胺基酸在基因序列中之實際觀測數的比值，計算同義密碼子相對使用頻率 (relative frequency of synonymous codon, RFSC)，作此計算可避免受到基因長短與胺基酸豐富度之影響：當密碼子之 RFSC 值大於 60%或者超過其對應胺基酸之同義密碼子平均 RFSC 值 1.5 倍時，視為高頻密碼子。

水稻白葉枯病 (rice bacterial blight) 是由黃單孢桿菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xoo*) 引起的一種細菌性維管束病害，為世界性主要稻作病害之一。而水稻品種之抗病性是由基因控制，目前在 Oryzabase 資料庫 (http://www.shigen.nig.ac.jp/rice/oryzabase/top.jsp, Kurata & Yamazaki 2006) 中現已登記命名 32 個水稻抗白葉枯病基因 (*Xa*)，其中已完全定序的有 *Xa1*、*xa5*、*xa13*、*Xa13*、*Xa21*、*Xa26* 及 *Xa27* 七個基因 (Song *et al*. 1995; Yoshimura *et al*. 1995, 1998; Anjali & McCouch 2004; Gu *et al*. 2005; Sun *et al*. 2006)。植物之抗病基因 (resistant gene, R gene) 的表現蛋白質結構分為五類 (Baker *et al*. 1997)：(1) 含有核苷酸結合位置 (nucleotide binding sites, NBS) 的細胞質受體類蛋白 (cytoplasmic receptor-like proteins) 和多白胺酸重複 (leucine-rich repeat, LRR) 序列區域，簡稱為 NBS-LRR；(2) 絲胺酸-酥胺酸激酶 (serine-threonine kinase)；(3) 含有大量細胞質外 LRR 區域的穿膜受體 (transmembrane receptor)；(4) 含細胞外 LRR 區域之穿膜受體和細胞內絲胺酸-酥胺酸激酶 (intracellualar serine-threonine kinase) 區域；及 (5) 其他。已知 *Xa1* 為上述第一類 R 基因，而 *Xa21* 和 *Xa26* 為第四類 R 基因，至於 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 之抗病防禦系統的生化途徑異於 *Xa1*、*Xa21* 和 *Xa26*，其表現蛋白質結構尚未清楚，目前被歸於其他之第五類 R 基因 (Yoshimura *et al*. 1998; Khush & Angeles 1999; Anjali & McCouch 2004; Gu *et al*. 2005; Sun *et al*. 2006)。為促進 *Xa* 蛋白質序列的結構研究，前作從 NCBI (National Center for Biotechnology Information) 之 GenBank 資料庫 (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html, Guisez *et al.* 1993) 下載已知序列的 7 個 *Xa* 基因共 17 條蛋白質序列為供試材料，探討不同 *Xa* 基因之蛋白質胺基酸組成的變異形式，結果發現不同 *Xa* 基因各有偏好的胺基酸，其中 *Xa1*、*Xa21*、*Xa26* 及 *Xa27* 基因之蛋白質序列中皆以白胺酸 (leucine, Leu) 出現頻率最高，*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 的丙胺酸 (alanine, Ala) 較其他 *Xa* 基因出現甚多，*xa5* 出現麩胺酸 (glutamic acid, Glu) 和酥胺酸 (threonine, Thr) 的頻率則遠高於其他基因 (Wei *et al*. 2008)。然而，對於 *Xa* 基因轉譯成胺基酸的密碼子使用特徵迄今尚無任何報導。因此，本研究進而利用 NCBI 資料庫內已知序列的 *Xa* 基因之 CDS 為試驗材料，首先估算其 RSCU 並結合多變數分析 (multivariate analysis)，以了解不同 *Xa* 基因之同義密碼子使用性的變異形式，再藉由 RFSC 篩選出高頻密碼子，期能深入剖析 *Xa* 基因之密碼子使用偏性，以有利於水稻的分子育種及抗性機制之研究。

材料與方法

Xa 基因序列之蒐集與下載

本研究自 NCBI 之 GenBank 資料庫下載已定序之 *Xa* 基因的 CDS，這些已知 *Xa* 基因的相關資訊整理如表 1，其 CDS 長度介於 318 bp–5409 bp 之間，其中 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 之 CDS 長度皆小於 1000 bp。*Xa1* 分別於 1999

及 2004 年登錄有兩條序列 (本文簡稱 *Xa1-1999* 及 *Xa1-2004*)，各位於第 4 及第 10 條染色體；*xa5* 為一隱性基因，位於第 5 條染色體；*Xa13* 及 *xa13* 分別為顯、隱性基因，皆位於第 8 條染色體；*Xa21* 基因家族位於第 11 條染色體，包含 7 個成員分別為 *Xa21-A1*、*Xa21-A2*、*Xa21-B*、*Xa21-C*、*Xa21-D*、*Xa21-E* 及 *Xa21-F*；*Xa26* 基因家族位於第 11 條染色體，包含 4 個成員分別為 *Xa26-MRKa*、*Xa26-MRKb*、*Xa26-MRKc* 及 *Xa26-MRKd* (本文簡稱 *Xa26a*、*Xa26b*、*Xa26c* 及 *Xa26d*)；*Xa27* 位於第 6 條染色體。

同義密碼子使用性的多變數分析

將上述各 *Xa* 基因之 CDS，利用 CodonW 密碼子分析軟體 (1.4 版，http://bioweb.pasteurur.fr/seqana/interfaces/codonw.html, Peden 1999)，先求出密碼子個數，再計算 RSCU，其計算式為 (Sharp *et al*. 1986)：

$$RSCU_{ij} = \frac{X_{ij}}{\frac{1}{n_i}\sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}}$$

X_{ij} 是第 i 個胺基酸中第 j 個密碼子出現的次數，n_i 為第 i 個胺基酸同義密碼子的數目。RSCU 用以觀測同義密碼子出現頻率是否相等，當 RSCU 值大於 1 時表示相對應的密碼子出現的次數比期望次數 (即該胺基酸所有同義密碼子出現頻率都相等) 為高，反之則表示出現次數相對較少 (Sharp *et al*. 1986)。

同義密碼子使用性是由多個物種或基因 (觀測值) 與各同義密碼子出現頻率 (變數) 所構成的資料矩陣來決定，這種多維資料形式所含之訊息，最適合利用多變數分析之統計技術來解析。多變數分析是一種綜合分析方法，能夠在多個研究對象和多個指標相互關聯的情況下分析出它們的統計規律。集群分析 (cluster analysis) 是多變數分析方法的一種，係利用一般邏輯程序，能根據多個變數間或研究對象的相似性與相異性，客觀地將相似者歸在同一群內，集群分析之結果最後以樹狀圖 (dendrogram) 的分支狀況來判斷群數 (Leps & Smilauer 1999)。對應分析 (correspondence analysis) 為 Benzecri 於 1973 年所提出，用於分析簡單二維及多維表格的行與列之間的對應關係，可將多維之變數或樣本於一個低維空間上以一個序列分佈圖 (ordination diagram) 呈現，從各變數或樣本落在序列分佈圖上之距離遠近，可用來輔助集群分析之樹狀圖的分群結果判斷，倘發現點間有群團現象表示可能是同一群。

為探討不同 *Xa* 基因間密碼子使用性的相似及相異程度，本研究在不考慮 Met、Trp 及終止密碼子 (UGA、UAG、UAA) 共 5 個無意義密碼子 (non-sense codon) 下，將所計算出各基因之 59 種同義密碼子之 RSCU 值，利用 STATISTICA 統計軟體 (7.0 版，Statsoft Inc. 2002) 以非加權配對算術平均法 (unweighted pair group method using arithmetic average, UPGMA) 進行集群分析，以求得歸群樹狀圖。UPGMA 是集群分析的演算方法之一，以群間個體所有成對距離的平均值為判斷，較不受離群值影響 (Mohna *et al*. 1992; Mumm *et al*. 1994)。接著，同樣再根據 RSCU 值利用 STATISTICA 統計軟體進行對應分析，由其行列之間的對應關係，求得序列分佈圖，以呈現基因間密碼子使用性之關係。最後綜合集群分析之樹狀圖和對應分析之序列分佈圖的結果，來共同決定群數。

高頻密碼子之判定

根據 RFSC 可用來篩選基因的高頻密碼子，其計算式為 (Lin *et al*. 2002)：

$$RFSC_{ij} = \frac{X_{ij}}{\sum_{j=1}^{n_i} X_{ij}} \times 100\%$$

X_{ij} 是第 i 個胺基酸中第 j 個密碼子出現的次

表 1. 已知序列之水稻 *Xa* 基因相關資訊

Table 1. Information of rice *Xa* genes with known sequences [z]

Label	Gene symbol	Submitted year	Accession no. in NCBI	Definition	Gene length	Chr. no.	CDS [y] Location	CDS [y] Length
Xa1-1999	*Xa1*	1999	AB002266	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) mRNA for *Xa1*	5910	4	113..5521	5409
Xa1-2004	*Xa1*	2004	NM_194685	*Oryza sativa*(*japonica* cultivar-group) putative bacterial blight resistance protein *Xa1*-like protein, mRNA	4206	10	1..4206	4206
xa5	*xa5*	2004	AY643716	*Oryza sativa (indica* cultivar-group) transcription factor IIA gamma subunit (TFIIAy) mRNA, partial cds.	318	5	1..318	318
xa13	*xa13*	2006	DQ421394	*Oryza sativa (indica* cultivar-group) cultivar IRBB13 disease resistant allele *xa13 (xa13)* gene, complete cds.	924	8	1..924	924
Xa13	*Xa13*	2006	DQ421395	*Oryza sativa (indica* cultivar-group) cultivar IR64 disease resistant allele *XA13 (Xa13)* gene, complete cds.	924	8	1..924	924
Xa21-A1	*Xa21*	1997	U72725	*Oryza longistaminata* receptor kinase-like protein gene	8416	11	4771..7384, 7676..8052	2991
Xa21-A2	*Xa21*	1998	U72727	*Oryza longistaminata* receptor kinase-like protein, pseudogene sequence	5940	11	2151..4764, 4872..5248	2991
Xa21-B	*Xa21*	1995	U37133	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group*)* receptor kinase-like protein gene	3921	11	1..2677, 3521..3921	3078
Xa21-C	*Xa21*	1998	U72723	*Oryza longistaminata* receptor kinase-like protein gene, pseudogene	19639	11	15118..17720, 17827..18201	2978
Xa21-D	*Xa21*	1997	U72726	*Oryza longistaminata* receptor kinase-like protein	13341	11	2367..4205	1839
Xa21-E	*Xa21*	1997	U72724	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) receptor kinase-like protein gene	9424	11	2819..5260	2442
Xa21-F	*Xa21*	2005	U72728	*Oryza longistaminata* receptor-like kinase protein, pseudogene sequence	7204	11	1683..4352, 5147..5547	3071
Xa26a	*Xa26*	2006	DQ355952	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) receptor kinase MRKa	3401	11	14225..17135, 17240..17625	3297
Xa26b	*Xa26*	2006	DQ355952	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) bacterial blight resistance protein *Xa26*	3631	11	21725..24659, 24765..25141	3312
Xa26c	*Xa26*	2006	DQ355952	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) receptor kinase MRKc	3456	11	34496..34911, 35026..37951	3342
Xa26d	*Xa26*	2006	DQ355952	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) cultivar Minghui 63 receptor kinase pseudogene	11396	11	2021..3423, 9305..10839, 13028..13416	3327
Xa27	*Xa27*	2005	AY986491	*Oryza sativa* (*indica* cultivar-group) *Xa27* gene, *Xa27*-IR24 allele	2393	6	1590..1931	342

[z] Source: Oryzabase and NCBI databases, searched from to Feb. 29, 2008.
[y] CDS: coding domain sequence.

數，n_i 為第 i 個胺基酸同義密碼子的數目。若某一密碼子之 RFSC 值大於 60%或者超過其對應胺基酸之同義密碼子平均 RFSC 值 1.5 倍，即視為高頻密碼子。由於 CodonW 分析軟體並未提供 RFSC 之計算，本研究是利用 Excel 軟體編寫公式而求得各密碼子之 RFSC 值及判斷高頻密碼子。

結 果

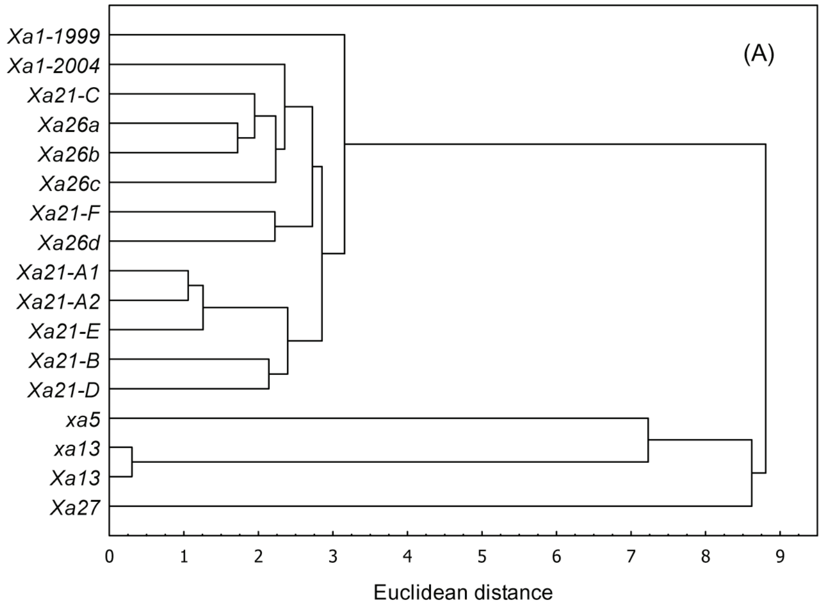
Xa 基因同義密碼子使用性之多變數分析

根據 17 個 *Xa* 基因及其家族之 CDS 的各 59 種同義密碼子之 RSCU 值進行集群分析及對應分析之結果，列如圖 1。由集群分析之樹狀圖顯示 (圖 1A)，在歐氏距離 (Euclidean distance) 7.23 時，*Xa* 基因及其家族根據 RSCU 值可被分成 4 群：*Xa1-1999*、*Xa1-2004*、*Xa21-C*、*Xa26a*、*Xa26b*、*Xa26c*、*Xa21-F*、*Xa26d*、*Xa21-A1*、*Xa21-A2*、*Xa21-E*、*Xa21-B* 及 *Xa21-D* 為同一群，*xa13* 和 *Xa13* 自成一群，*xa5* 和 *Xa27* 則各自成群。而對 17 個 *Xa* 基因及其家族的 RSCU 值進行對應分析，其兩個主要因子軸能解釋變異的貢獻分別為 56.94%和 19.61%，總貢獻量合計佔 76.55%，說明存在影響其密碼子使用頻率的主要趨勢，於是由圖 1B 之二維序列分佈圖可知，*xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 都甚遠離於其他 *Xa* 基因，且 *xa5* 及 *Xa27* 亦各偏離於 *xa13* 及 *Xa13*，即對應分析與集群分析所獲分群結果相當一致，17 個 *Xa* 基因及其家族根據同義密碼子使用性之 RSCU 值大致可被區分成 4 群：第 I 群為 *Xa1-1999*、*Xa1-2004*、*Xa21-C*、*Xa26a*、*Xa26b*、*Xa26c*、*Xa21-F*、*Xa26d*、*Xa21-A1*、*Xa21-A2*、*Xa21-E*、*Xa21-D* 及 *Xa21-B*，第 II 群為 *xa5*，第 III 群為 *xa13* 及 *Xa13*，以及第 IV 群為 *Xa27*。

Xa 基因高頻密碼子之判定

根據上述 RSCU 值分群結果，接著分別計算各群基因之 RFSC，並依照其密碼子之 RFSC 值大於 60%或者超過其對應胺基酸之同義密碼子平均 RFSC 值 1.5 倍的原則，找出各群基因之高頻密碼子，結果如表 2 所示：在不考慮 Met、Trp 不具同義密碼子外，第 I 群基因 (*Xa1-1999*、*Xa1-2004*、*Xa21-C*、*Xa26a*、*Xa26b*、*Xa26c*、*Xa21-F*、*Xa26d*、*Xa21-A1*、*Xa21-A2*、*Xa21-E*、*Xa21-D* 及 *Xa21-B*) 僅 6 種胺基酸 (Pro、Thr、Ala、Asp、Cys、Arg) 具有高頻密碼子，第 II 群基因 (*xa5*) 除 Thr 和 Asp 外其餘 16 種胺基酸皆有高頻密碼子，第 III 群基因 (*xa13*、*Xa13*) 之所有胺基酸存在高頻密碼子，而第 IV 群基因 (*Xa27*) 除 Asp 不具特定密碼子偏性外其餘 16 種胺基酸都具有高頻密碼子 (*Xa27* 之 CDS 轉譯之蛋白質序列中不含 Lys)；由此顯示 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 基因表現蛋白之胺基酸大都具有特定偏好的密碼子之特徵，而且其高頻密碼子幾乎都以 C 或 G 結尾。針對不同 *Xa* 基因各自偏好的幾個主要胺基酸 (Wei *et al.* 2008) 而言，由表 2 可看出，*Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 之表現蛋白質中的 Leu 並無偏好任何密碼子，而 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 的 Leu 皆高度偏好使用 CUC；所有 *Xa* 基因在 Ala 都具有高頻密碼子，第 I 群基因之 *Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 的 Ala 較偏好 GCA，而 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 的 Ala 都偏好使用 GCC；此外，*xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 在 Glu 也都偏好 GAG，但僅有 *xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 的 Thr 偏好 ACC，而 *xa13* 及 *Xa13* 的 Thr 除偏好 ACC 外也偏好 ACG。

由於 *Xa1*、*Xa21*、*Xa26* 分屬於不同類別的 R 基因，因此在第 I 群基因內再進而分別檢視這 3 個基因各胺基酸之同義密碼子的 RFSC 值 (表 3)，結果顯示這 3 個基因在 Ala 都偏好 GCA，除此第一類 R 基因的 *Xa1* 在 Thr 及 His 也各自偏好 ACA 及 CAU；同屬第四類 R 基因的 *Xa21* 和 *Xa26* 在 Pro、Ala、Asp 及 Arg 都一致具有高頻密碼子，其 Pro、Ala 及 Asp 都同樣各偏好



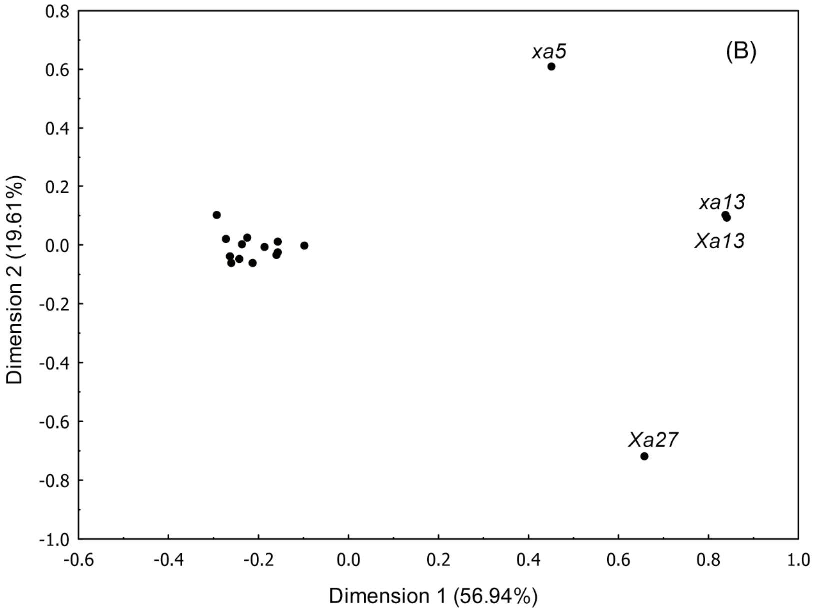


圖 1. 17 個水稻 *Xa* 基因及其家族之 CDS 序列根據同義密碼子相對使用度 (RSCU) 的分群結果。(A) 集群分析採 UPGMA 法之樹狀圖，(B) 對應分析之序列分布圖。

Fig. 1. Grouping results of 17 CDSs of rice *Xa* genes and their families according to relative synonymous codon usage (RSCU). (A) Dendrogram of cluster analysis using UPGMA, (B) Ordination diagram of correspondence analysis.

表 2. 水稻 *Xa* 基因根據同義密碼子偏好性相對使用頻度 (RFSC) 所判定之高頻密碼子

Table 2. High-frequency codon of rice *Xa* genes identified from relative frequency of synonymous codon (RFSC)

Amino acid	Codon	I [z]	II	III	IV	Amino acid	Codon	I	II	III	IV
Phe	UUU	42.8	20.0	0.0	0.0	Ala	GCU	28.1	0.0	2.4	11.1
	UUC	57.2	**80.0** [y]	**100.0**	**100.0**		GCC	22.6	**80.0**	**72.3**	**61.1**
Leu	UUA	10.3	0.0	0.0	0.0		GCA	**38.0**	20.0	7.2	5.6
	UUG	17.7	18.2	5.9	0.0		GCG	11.4	0.0	18.1	22.2
	CUU	19.3	9.1	2.9	4.0	Tyr	UAU	49.8	0.0	3.8	0.0
	CUC	19.2	**54.5**	**64.7**	**68.0**		UAC	50.2	**100.0**	**96.2**	**100.0**
	CUA	11.1	9.1	0.0	8.0	His	CAU	55.8	0.0	0.0	0.0
	CUG	22.4	9.1	26.5	20.0		CAC	44.2	**100.0**	**100.0**	**100.0**
Ile	AUU	34.9	**60.0**	0.0	**50.0**	Gln	CAA	53.1	**80.0**	0.0	33.3
	AUC	36.5	40.0	**100.0**	**50.0**		CAG	46.9	20.0	**100.0**	**66.7**
	AUA	28.6	0.0	0.0	0.0	Asn	AAU	50.8	33.3	0.0	0.0
Val	GUU	29.9	**37.5**	2.6	14.0		AAC	49.2	**66.7**	**100.0**	**100.0**
	GUC	19.0	25.0	**47.4**	**86.0**	Lys	AAA	51.0	12.5	0.0	0.0
	GUA	18.1	12.5	0.0	0.0		AAG	49.0	**87.5**	**100.0**	0.0
	GUG	33.0	25.0	**50.0**	0.0	Asp	GAU	**62.1**	50.0	0.0	50.0
Ser	UCU	21.2	20.0	0.0	20.0		GAC	37.9	50.0	**100.0**	50.0
	UCC	17.1	**30.0**	**50.0**	**40.0**	Glu	GAA	54.1	27.3	0.0	33.3
	UCA	19.3	10.0	0.0	0.0		GAG	45.9	**72.7**	**100.0**	**66.7**
	UCG	11.4	0.0	18.2	**40.0**	Cys	UGU	39.2	**66.7**	0.0	0.0
	AGU	12.3	0.0	0.0	0.0		UGC	**60.8**	33.3	**100.0**	**100.0**
	AGC	18.7	**40.0**	**31.8**	0.0	Arg	CGU	11.5	0.0	0.0	0.0
Pro	CCU	27.9	0.0	5.6	**50.0**		CGC	12.6	0.0	**37.5**	**75.0**
	CCC	14.4	0.0	27.8	**50.0**		CGA	11.2	0.0	0.0	25.0
	CCA	**43.7**	0.0	5.5	0.0		CGG	11.8	33.3	12.5	0.0
	CCG	14.0	**100.0**	**61.1**	0.0		AGA	**26.0**	0.0	0.0	0.0
Thr	ACU	**42.4**	36.3	0.0	25.0		AGG	**26.8**	**66.7**	**50.0**	0.0
	ACC	20.5	27.3	**56.8**	**75.0**	Gly	GGU	30.0	0.0	11.8	25.0
	ACA	26.9	18.2	0.0	0.0		GGC	27.8	**100.0**	**52.9**	**66.7**
	ACG	10.2	18.2	**43.2**	0.0		GGA	25.2	0.0	17.7	8.3
							GGG	17.0	00	17.6	0.0

[z] Gene group: I, *Xa1-1999*; *Xa21-A1*, *Xa21-A2*, *Xa21-B*, *Xa21-D*, *Xa21-E*; *Xa1-2004*, *Xa21-C*, *Xa21-F*, *Xa26a*, *Xa26b*, *Xa26c*, *Xa26d*; II, *xa5*; III, *xa13* and *Xa13*; IV, *Xa27*.
[y] High-frequency codon indentified from RFSC (bold and underline).

CCA、GCA 及 GAU，不過 *Xa21* 及 *Xa26* 在 Arg 的高頻密碼子並不相同；此外，*Xa21* 的 Thr、Glu 及 Cys 也都具有高頻密碼子，但 *Xa26* 則無。從表 3 可發現，顯然 *Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 僅少數胺基酸具有高頻密碼子，而這些胺基酸幾乎偏好以 A 或 U 結尾的密碼子。

討　論

密碼子使用偏性會因物種或基因不同而有所差異 (Gu *et al*. 2002; Fan *et al*. 2003)，本研究利用 RSCU 之多變數分析進行 *Xa* 基因同義密碼子使用性分析，可大致將 *Xa* 基因分為 4 群 (圖 1)，據此進而利用 RFSC 找出各群 *Xa* 基因表現蛋白之胺基酸的高頻密碼子 (表 2)。綜合各項結果顯示，CDS 長度大於 1000 bp 的 *Xa* 基因 (第 I 群之 *Xa1-1999*、*Xa21-A1*、*Xa21-A2*、*Xa21-B*、*Xa21-D*、*Xa21-E*、*Xa1-2004*、*Xa21-C*、*Xa21-F*、*Xa26a*、*Xa26b*、*Xa26c*、*Xa26d*) 只有少數胺基酸具有高頻密碼子，即大多數胺基酸並無明顯偏好任何密碼子。而 CDS 長度較短 (318–924 bp) 的 *Xa* 基因 (第 II、III 及 IV 群基因的 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27*)，絕大多數的胺基酸都有高頻密碼子，顯示這些基因表現蛋白之胺基酸具有高度的密碼子偏好性。此發現與 Liu *et al.* (2003) 利用水稻品種 93-11 為材料探討基因長度對密碼子使用偏性之影響研究所得結果一致，即水稻中序列較短之基因的密碼子偏好性較大。此外，Liu (2006) 進行輻射菌 (*Deinococcus radiodurans*) 基因密碼子偏性分析，也發現基因之 CDS 長度為影響基因密碼子使用性之主要因素之一。

密碼子使用偏性會直接影響到基因轉錄的效率，進而決定 mRNA 的濃度 (Xia 1996)。Coghlan *et al.* (2000) 研究酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的密碼子使用偏性與 mRNA 的濃度及蛋白質的相關性時，也發現密碼子使用偏性可能與增加轉錄及轉譯的效率 (如提高準確度) 及減少轉譯過程中能量消耗有關。*Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 基因的表現蛋白質皆含有多白胺酸重複 (leucine-rich repeat, LRR) 序列區域結構 (Song *et al*. 1995; Yoshimura *et al*. 1998; Sun *et al*. 2006)，Wei *et al*. (2008) 指出 *Xa* 基因之表現蛋白質中的 Leu 為水稻具有白葉枯病抗性之重要胺基酸，*Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 的表現蛋白質序列皆含有豐富的 Leu。而本研究發現 *Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 在 Leu 並無偏好任何密碼子 (表 2、3)，顯示這 3 個 *Xa* 基因表現蛋白質的 Leu 可任意選擇其同義密碼子轉譯，此結果有助於穩定 *Xa* 基因之蛋白質結構，可不受突變與外力而影響其抗性。相較於其他 *Xa* 基因，*Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 僅有少數胺基酸具有高頻密碼子，且大多偏向選擇 A 或 U 結尾的密碼子。第一類 R 基因的 *Xa1* 與第四類 R 基因的 *Xa21* 及 *Xa26* 僅在 Ala 都偏好 GCA，在其他胺基酸則密碼子偏好性不盡相同；而同屬於第四類 R 基因的 *Xa21* 及 *Xa26* 在某些胺基酸的密碼子偏好特性仍多少有異。

至於 CDS 長度較短的 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 基因都不具 LRR 蛋白質結構 (Khush & Angeles 1999; Anjali & McCouch 2004; Gu *et al*. 2005; Sun *et al*. 2006)，且其胺基酸組成偏好性明顯不同 (Wei *et al*. 2008)，由本研究結果發現這些基因幾乎所有胺基酸都特別偏好以 C 或 G 結尾的同義密碼子 (表 2)，表示 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 基因編碼區的鹼基組成 (G + C 含量) 強烈影響其同義密碼子。*Xa27* 蛋白質序列中有非常多的 Leu 且含量遠高於其他 *Xa* 基因 (Wei *et al*. 2008)，按可能與 *Xa27* 之產物內含 3 個核定位信號 (nuclear localized signal, NLS) 模組之 C 端保守區域和一個轉錄活化區的細胞核局部性第 III 型作用器有關 (Gu *et al*. 2005)，由本研究發現 *Xa27* 的 Leu 高度偏好使用 CUC (表 2)，此與 *Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 可由任何密碼子轉譯成 Leu 的結果完全不同 (表 2、3)。

表 3. 水稻 *Xa1, Xa21, Xa26* 基因根據同義密碼子偏好性相對使用頻度 (RFSC) 所判定之高頻密碼子

Table 3. High-frequency codon of rice *Xa1, Xa21, Xa26* genes identified from relative frequency of synonymous codon (RFSC)

Amino acid	Codon	*Xa1*	*Xa21*	*Xa26*	Amino acid	Codon	*Xa1*	*Xa21*	*Xa26*
Phe	UUU	45.5	41.1	44.0	Ala	GCU	24.4	27.5	31.1
	UUC	54.5	58.9	56.0		GCC	23.2	24.1	20.5
Leu	UUA	10.5	10.0	10.5		GCA	**37.8**	**38.6**	**37.4**
	UUG	17.1	17.6	18.3		GCG	14.6	9.8	11.0
	CUU	20.8	19.5	18.2	Tyr	UAU	**60.5**	42.1	51.0
	CUC	21.4	19.4	17.4		UAC	39.5	57.9	49.0
	CUA	8.2	9.8	14.9	His	CAU	**60.9**	53.5	55.0
	CUG	22.0	23.7	20.6		CAC	39.1	46.5	45.0
Ile	AUU	33.1	36.4	33.9	Gln	CAA	52.2	54.4	51.9
	AUC	40.6	36.1	34.7		CAG	47.8	45.6	48.1
	AUA	26.3	27.5	31.4	Asn	AAU	57.0	54.7	42.5
Val	GUU	22.3	33.3	30.9		AAC	43.0	45.3	57.5
	GUC	19.9	18.4	19.1	Lys	AAA	47.1	54.5	50.0
	GUA	24.7	17.3	14.4		AAG	52.9	45.5	50.0
	GUG	33.1	31.0	35.6	Asp	GAU	57.3	**66.2**	**61.5**
Ser	UCU	22.7	19.9	22.3		GAC	42.7	33.8	38.5
	UCC	16.4	19.0	14.7	Glu	GAA	46.9	**64.6**	46.5
	UCA	20.1	18.3	20.6		GAG	53.1	35.4	53.5
	UCG	5.4	15.1	9.2	Cys	UGU	32.6	38.4	48.1
	AGU	18.1	10.5	11.4		UGC	**67.4**	**61.6**	51.9
	AGC	17.4	17.2	21.9	Arg	CGU	12.6	11.3	10.8
Pro	CCU	27.3	30.9	24.4		CGC	9.3	14.7	12.6
	CCC	20.2	13.0	13.8		CGA	8.2	10.9	15.0
	CCA	35.4	**42.1** [z]	**49.3**		CGG	12.6	9.6	15.0
	CCG	17.2	14.0	12.4		AGA	22.0	**32.1**	19.8
Thr	ACU	31.5	26.2	32.4		AGG	**35.2**	21.5	**26.9**
	ACC	24.8	21.5	30.4	Gly	GGU	23.4	33.0	29.0
	ACA	33.9	**39.1**	24.0		GGC	26.3	29.0	26.7
	ACG	9.7	13.2	13.2		GGA	26.9	22.4	28.7
						GGG	23.4	15.6	15.6

[z] High-frequency codon indentified from RFSC (bold and underline).

由此顯見，同樣對白葉枯病菌產生抗性的不同 *Xa* 基因間所呈現的胺基酸組成及密碼子使用偏性的多樣性，揭示出選擇在抗病基因的演化中有著重要的作用。蛋白質序列具有 LRR 區域結構之 *Xa1*、*Xa21* 及 *Xa26* 的 CDS 長度較長，僅少數胺基酸具有高頻密碼子，且大多偏好以 A 或 U 結尾的密碼子；而 *xa5*、*xa13*、*Xa13* 及 *Xa27* 之蛋白質序列不具 LRR 區域結構且 CDS 較短，其幾乎所有胺基酸都偏好以 C 或 G 結尾的密碼子。按照中性進化理論的觀點，核苷酸序列中密碼子第 3 位鹼基的變化受到突變和自然選擇的影響是中性或近中性的 (Sharp *et al.* 1993)，由此似乎意味著可能由於鹼基突變偏好 G + C 或 A + U 而造成這些 *Xa* 基因之同義密碼子使用偏性。近來也已有研究發現水稻的 G + C 含量決定了密碼子的使用，其密碼子使用偏性之產生主要與轉錄水平上的突變有關 (Liu *et al.* 2003)。同義密碼子使用偏性究竟是由突變偏性或轉譯選擇產生，還是兩者共同作用產生，迄今結論不甚一致 (Salim & Cavalcanti 2008)，未來將值得進一步探討 *Xa* 基因密碼子使用偏性之影響因素，以有利 *Xa* 基因分子機制演化上之研究，並促進蛋白質結構預測與基因改良。

誌　謝

本研究承蒙行政院農業委員會農業生物技術國家型科技計畫 [計畫編號：94 農科-5.2.1-農-C1(8)] 及國家科學委員會 (計畫編號：NSC95-2317-B-055-004) 補助經費，特致謝忱。

引用文獻 (Literature cited)

Anfinsen, C. B. 1973. Principal that govern the folding of protein chains. Science 181:223–230.

Anjali, S. I. and S. R. McCouch. 2004. The rice bacterial blight resistance gene *xa5* encodes a novel form of disease resistance. Mol. Plant-Microbe Interact. 17:1348–1354.

Baker, B., P. Zambryski, B. Staskawicz, and S. P. Dinesh-Kumar. 1997. Signaling in plant-microbe interactions. Science 276:726–733.

Benzecri, J. P. 1973. Lanalyse des Donnees. II. Lanalyse des Correspondances. Dunod. Paris, France. 619 pp.

Berezhnoy, A. Y. and S. A. Duplij. 2005. Dependence of nucleotide physical properties on their placement in codons and determinative degree. J. Zhejiang Univ. Sci. 6:948–960.

Coghlan, A. and K. H. Wolfe. 2000. Relationship of codon bias to mRNA concentration and protein length in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast 16:1131–1145.

Comeron, J. and M. Aguade. 1998. An evaluation of measure of synonymous codon usage bias. J. Mol. Evol. 47:268–274.

Dos, R. M., L. Wernisch, and R. Savva. 2003. Unexpected correlations between gene expression and codon usage bias from microarray data for the whole *Escherichia coli* K-12 genome. Nucleic Acids Res. 31:6976–6985.

Duret, L. 2000. tRNA gene number and codon usage in the *C. elegans* genome are co-adapted for optimal translation of highly espressed genes. Trends Genet. 16:287–289.

Duret, L. and D. Mouchiroud. 1999. Expression pattern and, surprisingly, gene length shape codon usage in *Caenorhabditis*, *Drosophila*, and *Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:4482–4487.

Fan, S. H., A. G. Guo, L. W. Shan, and X. P. Hu. 2003. Analysis of genetic code preference in *Arabidopsis thaliana*. Prog. Biochem. Biophys. 30:221–225. (in Chinese with English abstract)

Gu, W. J., J. M. Ma, T. Zhou, X. Sun, and Z. H. Lu. 2002. Codon usage in genes coding for proteins with different tertiary structures. Acta Biophys. Sinica. 18:81–86. (in Chinese with English abstract)

Gu, W. J., J. M. Ma, T. Zhou, X. Sun, and Z. H. Lu. 2004. The relationship between synonymous codon usage and protein structure in *Escherichia coli* and Homo sapiens. BioSystems 73:89–97.

Gu, K., B. Yang, D. Tian, L. Wu, D. Wang, C. Sreekala, F. Yang, Z. Chu, G. L. Wang, F. F. White, and Z. Yin. 2005. R gene expression induced by a type-III effector triggers disease resistance in rice. Nature 435:1122–1125.

Guisez, Y., J. Robbins, E. Remaut, and W. Fiers. 1993. Folding of the MS2 coat protein in *Escherichia coli* is modulated by translational pauses resulting from mRNA secondary structure and codon usage: a hypothesis. J. Theor. Biol. 162:243–252.

Gupta, S. K., S. K. Majumdar, T. Bhattacharya, and T. C. Ghosh. 2000. Studies on the relationships between the synonymous codon usage and protein secondary structural units. Biochem. Biophys. Res. Commun. 269:692–696.

Hou, Z. C. and N. Yang. 2003. Factors affecting codon usage in *Yersinia pestis*. Acta Biochem. Biophys. Sinica 35:580–586.

Hu, X. Z. and Q. Z. Li. 2005. The further discussion for context correlation of codons in secondary structures of proteins. Acta Scientiarum Naturalium Univ. NeMongol. 36:294–300. (in Chinese with English abstract)

Karlin, S. and J. Mrazek. 1996. What drives codon choices in human genes? J. Mol. Biol. 262:459–472.

Khush, G. S. and E. R. Angeles. 1999. A new gene for resistance to race 6 of bacterial blight in rice, *Oryza sativa* L. Rice Genet. Newsl. 16:92–93.

Knight, R. D., J. F. Stephen, and L. F. Landweber. 2001. A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino-acid usage and GC composition within and across genomes. Genome Biol. 2:1–13.

Kurata, N. and Y. Yamazaki. 2006. Oryzabase. An integrated biological and genome information database for rice. Plant Physiol. 140:12–17.

Leps, J. and P. Smilauer. 1999. Multivariate Analysis of Ecological Data. Faculty of Biological Science. Univ. South Bohemia, Ceske Budejovice. 110 pp.

Li, W. J. and J. N. Song. 2003. How much protein secondary structural information do synonymous codons carry? Acta Biophys. Sinica 19:41–46. (in Chinese with English abstract)

Lin, T., Z. H. Ni, M. S. Shen, and L. Chen. 2002. High-frequency codon analysis and its application in codon analysis of tobacco. J. Xiamen Univ. (Nat. Sci.) 5:551–554. (in Chinese with English abstract)

Liu, Q. P., J. Tan, and Q. Z. Xue. 2003. Synonymous codon usage bias in the rice cultivar 93-11 (*Oryza sativa* L. *ssp. Indica*). Acta Genet. Sin. 30:335–340. (in Chinese with English abstract)

Liu, Q. P. and Q. Z. Xue. 2005. Comparative studies on codon usage pattern of chloroplasts and their host nuclear genes in four plant species. J. Genet. 84: 55–62.

Liu, Q., S. Dou, Z. Ji, and Q. Xue. 2005. Synonymous codon usage and gene function are strongly related in *Oryza sativa*. Biosystems 80:123–131.

Liu, Q. P. 2006. Analysis of codon usage pattern in the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. BioSystems 85:99–106.

Ma, J. M., W. J. Gu, T. Zhou, X. Sun, Z. H. Lu. 2002. Method for the design of mRNA detecting genechip based on codon usage bias. J. Southeast Univ. (Nat. Sci. Ed.) 32:581–585. (in Chinese with English abstract)

Mohna, F. I., P. Shen, S. C. Jong, and K. Orikono. 1992. Molecular evidence supports the separation of *Lentinula edodes* from *Lentinus* and related genera. Can. J. Bot. 70:2446–2452.

Moriyama, E. N. and J. R. Powell. 1998. Gnen length and codon usage bias in *Drosophila melanogaster*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res. 26:3188–3193.

Mumm, R. H., J. Hubert, and J. W. Dudley. 1994. A classification of 148 U.S. maize inbreds: II. Validation of cluster analysis based on RFLPs. Crop Sci. 34:852–865.

Peden, J. F. 1999. Analysis of Codon Usage. PhD thesis. Depart. Genetics, Univ. Nottingham. 226 pp.

Peixoto, L., A. Zavala, H. Romero, and H. Musto. 2003. The strength of translational selection for codon usage varies in the three replicons of *Sinorhizobium melioti*. Gene 320:109–116.

Percudani, R., A. Pavesi, and S. Ottonello. 1997. Transfer RNA gene redundancy and translational selection in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Mol. Biol. 268: 322–330.

Romero, H., A. Zavala, and H. Musto. 2000. Codon usage in *Chlamydia trachomatis* is the result of strand-specific mutational biases and a complex pattern of selective forces. Nucleic Acids Res. 28:2084–2090.

Romero, H., A. Zavala, H. Musto, and G. Bernardi. 2003. The influence of translational selection on codon usage in fishes from the family *Cyprinidae*. Gene 317:141–147.

Salim, H. M. W. and A. R. O. Cavalcanti. 2008. Factors influencing codon usage bias in genomes. J. Braz. Chem. Soc. 19:257–262.

Sharp, P. M. and W. H. Li. 1986. An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. J. Mol. Evol. 24:28–38.

Sharp, P. M., M. Stenico, J. F. Peden, A. T. Lloyd. 1993. Codon usage: mutational bias, translational selection, or both? Biochem. J. 21:835–841.

Sharp, P. M., M. Stenico, and A. T. Lloyd. 1994. Codon usage in *Caenorhabditis elegans*: delineation of translational selection and mutational biases. Nucleic Acids Res. 22:2437–2446.

Shi, X. F., J. F. Huang, C. R. Liang, S. Q. Liu, J. Xie, and C. Q. Liu. 2001. Is there a close relationship between synonymous codon bias and codon-anticodon binding strength in human genes? Chinese Sci. Bull. 12:1015–1019.

Song, W. Y., G. L.Wang, L. L. Chen, H. S .Kim, L. Y. Pi, T. Holsten, J. Gardner, B. Wang, W. X. Zhai, L. H. Zhu, C. Frauquet, and P. Ronald. 1995. A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, *Xa21*. Science 270:1804–1806.

Statsoft Inc. 2002. STATISTICA: The Small Book Chinese Version. USA. 144 pp.

Stenström, C. M., H. Jin, L. L. Major, W. P. Tate, and L. A. Isaksson. 2001. Codon bias at the 3′-side of the initiation codon is correlated with translation initiation efficiency in *Escherichia coli*. Gene 263:273–284.

Sun, X. L., Y. L. Cao, and S. P. Wang. 2006. Point mutations with positive selection were a major force during the evolution of a receptor-kinase resistance gene family of rice. Plant Physiol. 140:998–1008.

Wei, M. L., Y. H. Chung, C. T. Lu, and H. Y. Lu. 2008. Multivariate analysis of amino acid composition in proteins from rice bacterial blight resistance genes. J. Taiwan Agric. Res. 57:161–174. (in Chinese with English abstract)

Xia, X. 1996. Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. Genetics 144:1309–1320.

Yoshimura, S., A. Yoshimura, N. Iwata, S. R. McCouch, M. L. Abenes, M. Baraoidan, T. W. Mew, and R. J. Nelson. 1995. Tagging and combining bacterial blight resistance genes in rice using RAPD and RFLP markers. Mol. Breed. 1:375–387.

Yoshimura, S., U. Yamanouchi, Y. Katayose, S. Toki, Z. X. Wang, I. Kono, N. Kurta, M. Yano, N. Iwata, and T. Sasaki. 1998. Expression of *Xa1*, a bacterial blight-resistance gene in rice, is induced by bacterial inoculation. Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 1663–1668.

Synonymous Condon Usage Bias in Rice Genes with Resistance to Bacterial Blight (*Xanthomonas oryza*)[1]

Meng-Li Wei[2], Yi-Han Chung[2], Chun-Tang Lu[2], and Hsiu-Ying Lu[3,4]

Abstract

Wei, M. L., Y. H. Chung, C. T. Lu, and H. Y. Lu. 2009. Synonymous condon usage bias in rice genes with resistance to bacterial blight (*Xanthomonas oryza*). J. Taiwan Agric. Res. 58:155–168.

Analysis of codon usage is important in understanding the molecular mechanism of rice genes with resistance to bacterial blight caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. A total of 17 coding domain sequences (CDSs) of the completely sequenced genes, i.e., *Xa1*, *xa5*, *xa13*, *Xa13*, *Xa21*, *Xa26*, and *Xa27* were obtained through the access from public database of NCBI (National Center for Biotechnology Information) and they were used to analyze the condon usage bias. The use of correspondence analysis and cluster analysis of relative synonymous codon usage (RSCU) clearly separated the CDSs of *Xa* genes into four distinct groups. The relative frequency of synonymous codon (RFSC) was further used to indentify the high-frequency codons for each gene group. The results showed that *Xa1*, *Xa21*, and *Xa26* with leucine-rich repeat (LRR) domain protein structure and CDS length more than 1000 bp were found no codon usages in most amino acids, and preferred A- or U-ending codons in a few amino acids; whereas *xa5*, *xa13*, *Xa13*, and *Xa27* with non-LRR domain protein structure and shorter CDSs preferred C- or G-ending codons in almost all amino acids. The protein sequences of *Xa1*, *Xa21*, *Xa26*, and *Xa27* has been known to have abundant leucine (Leu). The *Xa1*, *Xa21*, and *Xa26* showed no significant codon bias in their Leu, that is they could choose any synonymous codon for Leu when translating to protein; whereas, *Xa27* exhibited CUC as the most preferred codon in Leu. It indicated that codon usage bias varied among rice genes with resistance to bacterial blight.

Key words: *Xa* genes, Relative synonymous codon usage, Relative frequency of synonymous codon, Cluster analysis, Correspondence analysis.

---

1. Contribution No.2361 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: July 17, 2009.
2. Respectively, Assistant Researcher, Project Assistant, and Assistant Researcher, Crop Science Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Senior Researcher and Director, Technical Service Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: iying@tari.gov.tw; Fax: (04)23325176.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 58(3):169–175 (2009)

分析植體氮同位素組成鑑別有機蔬菜之初步評估 [1]

劉滄棽[2] 彭宗仁[3,4] 吳昇鴻[3] 范家華[3] 林毓雯[2]

摘　要

劉滄棽、彭宗仁、吳昇鴻、范家華、林毓雯。2009。分析植體氮同位素組成鑑別有機蔬菜之初步評估。台灣農業研究 58:169–175。

本試驗分析青江菜 (*Brassica chinensis* L.) 及所施用肥料之氮同位素組成 ($\delta^{15}N$)，以評估此透過氮同位素分析的方法是否能成為有機蔬菜的認證技術之一。本試驗共有四種處理，包括對照組 (CK)、有機肥組 (OF)、化肥組 (CF)，及有機肥與化肥混用組 (OC)。氮同位素分析結果顯示，蔬菜之$\delta^{15}N$ 值與所施肥料之種類有密切關聯，其中有機肥栽種之蔬菜 (OF) 的$\delta^{15}N$ 值 (約 19‰) 與有機肥之值 (約 17‰) 相當；相對地，由化肥栽種之蔬菜 (CF)，其$\delta^{15}N$ 值會如化肥之低值，約 0‰。再者，由此四處理試驗之分析結果推演，如果在產地上能同時分析蔬菜及所施用有機肥之$\delta^{15}N$ 值，且蔬菜之$\delta^{15}N$ 值大於有機肥之$\delta^{15}N$ 值的條件下，此蔬菜初步可認為是有機蔬菜。然而，要使本同位素方法成為高可信度的驗證技術，則還需有進一步的測試。

關鍵詞：氮同位素、有機蔬菜認證、有機及化學肥料。

前　言

所謂有機蔬果狹義之定義是栽種期間，沒有使用化肥、農藥、除草劑，且肥料必須用適用有機質肥料之有機農法所產出者。但有機農法較慣行農法有其不利之處 (Lin 1999)，如其總生產成本較慣行農法高約 2.0 至 4.2 倍；其主要病蟲害危害率較慣行農法高出 2 倍以上；其雜草數較慣行農法高約 1.5 至 3.6 倍。因此，為兼顧生產效益，在不危害土壤品質、人體健康的前提下，在栽種期間適量、合理地添加化肥或農藥是被認同的合理化施肥，其產物即所謂之安全蔬果。

然而市面上或有所聞，少部份商家以此非純有機蔬果或安全蔬果冒充有機蔬果，獲取不當利益；此現象更突顯有機商品認證的重要性。一般而言，農藥之是否殘存，現階段之檢測已行之有年，如吉園圃標章之蔬果；但對於蔬菜是否完全以有機肥栽種，現階段尚無法有效鑑別。因此，本試驗嘗試利用穩定氮同位素技術，評估其適用性。

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2362 號。接受日期：98 年 7 月 31 日。
2. 行政院農業委員會農業試驗所農業化學組副研究員、助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 國立中興大學土壤環境科學系副教授、研究生、研究助理。台灣 台中市。
4. 通訊作者，電子郵件：trpeng@dragon.nchu.edu.tw；傳真機：(04)22859950。

基本上，作物栽種時，作物之營養主要來自添加之肥料，以及支持其生長之土壤。在作物生長過程，土壤中或添加介質中的部份元素會顯現在植體中。利用穩定氮同位素鑑別有機蔬菜之原理，在於不同來源的氮會有不同的 ^{15}N 與 ^{14}N 的原子含量比值 ($^{15}N/^{14}N$)，造成彼此間之氮同位素組成 ($\delta^{15}N$) 會有差異；扼要而言，樣本之 $^{15}N/^{14}N$ 值越大，其 $\delta^{15}N$ 值也越大 (Peng *et al.* 2006) (δ 值之定義說明列於下述「材料與方法」章節)。造成此 $\delta^{15}N$ 值差異的原因是由於不同來源的氮，各經歷不同程度與相異之同位素分化作用 (isotope fractionation) 所致 (Peng *et al.* 2006)。此相異之 $\delta^{15}N$ 特徵類似一種示蹤劑，在作物吸收氮素後而標記在植體中；例如，在具高 $\delta^{15}N$ 值土壤之地區其植作亦顯示出較大之 $\delta^{15}N$ 值 (Mariotti *et al.* 1980; Hübner 1986)，或利用分析植體之 $\delta^{15}N$ 值以鑑別植物所吸收之氮來源 (Högberg 1997)。

文獻中顯示，不同來源的氮會有不同的 $\delta^{15}N$ 值，例如大氣中氮之 $\delta^{15}N$ 值約為 0‰，土壤有機氮的 $\delta^{15}N$ 值範圍為 3–8‰；化學肥料氮的 $\delta^{15}N$ 值範圍為 -2–4‰，動物排泄物的 $\delta^{15}N$ 值範圍為 10–25‰ (Kreitler & Jones 1975; Gormly & Spalding 1979; Kreitler 1979; Girard & Hillaire-Marcel 1997)。化學肥料的 $\delta^{15}N$ 值與大氣之值相似，是因為在化學肥料的製造過程中，多引用大氣中之氮作為原料之故 (哈柏法)；而動物排泄物之 $\delta^{15}N$ 值明顯較大是因為動物攝取食物吸收相關氮時，因鍵結能之差異關係，^{14}N 較易被動物吸收，相對而言不易被吸收之 ^{15}N 較易被排出；同時，新鮮的動物排泄物中之 $^{14}NH_3$ 較 $^{15}NH_3$ 容易揮發，進而導致動物排泄物相對於其它氮源明顯表現出較大的 $\delta^{15}N$ 值 (Peng *et al.* 2004)。基於化肥與動物排泄物 (有機肥) 之 $\delta^{15}N$ 值有明顯差距，預期如果施用化學肥料者，其植體中之 $\delta^{15}N$ 值應會與施用有機肥之值有所區別。

因此，本試驗分別以化肥與有機肥施用於短期蔬菜之栽種；接續分析栽培介質、植體、肥料之 $\delta^{15}N$ 值並加以比對，以驗證上述之推論。同時，藉由此試驗之成果，初步評估此技術是否可以作為後續建立有機蔬果鑑別之認證技術之一。因為碳亦為有機物的主要成分之一，在以質譜儀分析有機物的 $\delta^{15}N$ 值時，亦可同時分析其穩定碳同位素組成 ($\delta^{13}C$)，所以，本試驗也一併評估碳同位素組成在有機蔬果鑑別認證技術之適用性。

材料與方法

盆栽試驗

本試驗在國立中興大學土壤環境科學系溫室進行青江菜 (*Brassica chinensis* L.) 栽種試驗。使用之栽培介質為市售栽培土，成份標示為純泥炭土 30%，細蛇木屑 10%，椰纖土 20%，發泡煉石 10%；實驗分析此栽培土之有機質含量為 87.3%，全氮含量 2.4%，pH 為 6.6。種子直播於直徑 5 吋塑膠材質之栽盆，每一栽盆含栽培介質約 20 g。本試驗之供試肥料有兩種，一為市售雞糞堆肥，成份標示為有機質 40%，全氮 3%，磷酐 3%，氧化鉀 3%。另一種為市售化學肥料，成份標示為全氮 16%，磷酐 8%，氧化鉀 16%，氧化鎂 16%。

本試驗共有四種處理，施用雞糞堆肥 (OF)，施用化學肥料 (CF)，混施有機肥及化肥 (OC)，另設不施任何肥料之處理 (CK)；每種處理三重複。OF、CF 及 OC 各處理進行基肥與追肥二次施肥。各次施肥量為：OF，以有機肥 10 g 與栽培介質混合作為基肥，追肥時則將有機肥散施於介質表面，共計施 20 g。CF，秤取 1 g 化學肥料溶於 500 mL 去離子水，每次施用 200 mL 養液，共施 400 mL。OC，每次施肥使用有機肥 5 g，前述之化學肥料養液 100 mL；OC 共計施有機肥 10 g，化學肥料養液 200 mL。各處理於種子栽種後 16 天進行追肥，45 天後採收。

標本處理

將栽培介質、有機與無機肥料、採收之植體放入烘箱以 60℃、48 小時乾燥。乾燥後之固態樣品以瑪瑙研缽磨碎成粉末狀，分裝至暗色玻璃標本瓶中供後續質譜儀分析。

同位素組成測定

秤取乾燥樣品約 1 mg，以錫囊 (tin capsule) 包裹置入元素分析儀 (element analyzer) 中。元素分析儀中裝設有氧化管柱及還原管柱，氧化管柱內填充有氧化鉻 (chromium oxide) 及銀鈷氧化物 (silvered cobaltous oxide)；還原管柱則填滿銅粒 (copper)。當錫囊掉入氧化管柱時，因錫囊瞬間燃燒放熱，產生 1800℃以上的高溫，使樣品完全反應成 NO_X 與 CO_2。NO_X 經過還原管柱還原成 N_2 後，再由 GC 管柱分離 N_2 及 CO_2 氣體。

經過元素分析儀所產生的 N_2 及 CO_2 通入氣壓計 (gas controller)，以調節進入質譜儀之樣品及標準品的氣體濃度。質譜儀測定後，樣品之氮、碳同位素組成分別以δ^{15}N 及δ^{13}C 表之，代表樣品氣體相對於標準品之同位素比值，單位以‰ (千分比) 表之。對於測定δ^{15}N 而言，國際標準品為大氣之 N_2；對於測定δ^{13}C 而言，國際標準品為 PDB (Peng *et al.* 2006)。δ^{15}N 及δ^{13}C 之定義如下：

$$\delta^{15}N\ (‰) = \frac{\left(\frac{^{15}N}{^{14}N}\right)_{Sample} - \left(\frac{^{15}N}{^{14}N}\right)_{Air}}{\left(\frac{^{15}N}{^{14}N}\right)_{Air}} \times 1000 \qquad (1)$$

$$\delta^{13}C\ (‰) = \frac{\left(\frac{^{13}C}{^{12}C}\right)_{Sample} - \left(\frac{^{13}C}{^{12}C}\right)_{PDB}}{\left(\frac{^{13}C}{^{12}C}\right)_{PDB}} \times 1000 \qquad (2)$$

本研究使用中央研究院環境變遷中心之氣相比值質譜儀 (isotope ratio mass spectrometer) 進行δ^{15}N 及δ^{13}C 分析，使用之元素分析儀型號為 Carlo-Erba EA 2100，氣相比值質譜儀型號為 Thermo Finnigan Delta^{plus} Advantage。對於氮同位素組成分析而言，該中心之實驗室以 USGS 40 (δ^{15}N = -4.52‰) 及 Acetanilide (Merck) (δ^{15}N = -1.52‰) 作為校正基準的參考標本 (Working standard)，標本重複分析之精確度優於 0.15‰。對於碳同位素組成分析而言，則使用 USGS 40 (δ^{13}C = -26.24‰) 作為校正基準的參考標本，標本重複分析之精確度優於 0.20‰。

結　　果

δ^{15}N 值測定結果

青江菜種子之δ^{15}N 值為 2.4‰，栽培土之值為 3.5‰；使用之有機肥的δ^{15}N 值為 17.6‰，而化肥之值為 -0.3 ‰ (表 1)。由表 1 不同處理之試驗結果可知，如只施用具較小δ^{15}N 值之化

表 1. 栽培材料及不同處理青江菜之 δ^{15}N 和 δ^{13}C 分析值

Table 1. The δ^{15}N and δ^{13}C values of planting materials and those of *B. chinensis* L. with different treatments

Material/Treatment		δ^{15}N (‰)	δ^{13}C (‰)
Materials			
Seed		2.35	-28.76
Planting medium		3.49	-27.33
Organic fertilizer		17.64	-24.51
Chemical fertilizer		-0.30	-36.11
Treatments			
CK		9.56	-32.59
		5.46	-32.93
		4.62	-32.62
	Average (CK)	6.55	-32.71
OF		19.06	-30.53
		18.92	-31.44
		21.19	-31.76
	Average (OF)	19.72	-31.24
CF		0.99	-30.60
		-0.11	-33.00
		1.55	-31.53
	Average (CF)	0.81	-31.71
OC		7.12	-32.51
		15.71	-32.28
		15.54	-32.29
	Average (OC)	12.78	-32.29

肥 (CF)，則所栽種青江菜之$\delta^{15}N$平均值 (0.8‰) 會與所施用化肥之值一樣顯得較小。反之，如只施用具較大$\delta^{15}N$值之有機肥 (OF)，則所栽種青江菜之$\delta^{15}N$值 (19.7‰) 會與所施用有機肥之值一樣顯得較大。如果混用有機肥與化肥 (OC)，則青江菜之$\delta^{15}N$值為 12.8‰，此值介於 CF 與 OF 二者結果之間；如果不施用肥料 (CK)，則青江菜之$\delta^{15}N$值 (6.6‰) 略大於種子及栽培介質之值。

$\delta^{13}C$ 值測定結果

在$\delta^{13}C$值測定方面，雖然栽培材料間之值似有差異，也就是有機肥之$\delta^{13}C$值較化肥之值顯得較大；然而，不同處理之結果並沒有如$\delta^{15}N$值般會有明顯之差異。例如，不僅四種處理結果之$\delta^{13}C$值介於-32.7 至-31.2‰間 (表 1)，單用有機肥處理 (OF) 與單用化肥處理 (CF) 結果之$\delta^{13}C$值幾近相同。同時，此$\delta^{13}C$值為 C3 植物之特徵值 (Deines 1980)；因此，作物生長之碳來源主要經由光合作用，吸收大氣之 CO_2。

顯然地，由上述之試驗結果可知，作物之$\delta^{15}N$值與施用之肥料種類有明顯關聯，但$\delta^{13}C$值則否。歸納本試驗之$\delta^{15}N$值測定有下述之現象：如果只施用有機肥，則所栽種青江菜之$\delta^{15}N$值不僅會顯得如原施用有機肥般較大的現象，且會大於原施用有機肥之值；如果只施用化肥，則所栽種青江菜之$\delta^{15}N$值會與化肥之值相近。由於化肥與有機肥二者之$\delta^{15}N$值有明顯差異；所以，以有機肥栽種青江菜之$\delta^{15}N$值必然與以化肥栽種之值會有明顯且可分辨的差異。

討　論

青江菜為非豆科植物，因此其生長氮素之來源主要來自栽培介質或肥料所釋出之 NO_3^- 或 NH_4^+。除部份作物外，NO_3^- 為主要的吸收型態，惟 NO_3^-被作物吸收後，仍需先轉換為 NH_4^+，再變成胺基酸進入作物細胞，也就是氮同化作用 (Brady & Weil 2000)。此氮同化作用過程涉及微生物所造成之同位素分化作用且會造成植體富集 ^{15}N，使得植體之$\delta^{15}N$值大於所吸收 NO_3^- 或 NH_4^+之$\delta^{15}N$值 (Yoneyama 1996)。

此外，在土壤環境中發生有機質礦化或硝化作用時，顯著之氮同位素分化作用主要發生在較後期之硝化作用階段，而前期礦化作用之氮同位素分化作用影響，可忽略不計 (Kendall 1998)；因此，礦化作用產生之 NH_4^+的$\delta^{15}N$值會與其前身之有機質的$\delta^{15}N$值相似。然而，土壤環境中的 NH_4^+在石灰質或高 pH 土壤容易發生 NH_3 揮發作用；因揮發的 NH_3 具較小之$\delta^{15}N$值，導致剩餘之 NH_4^+表現出較原土壤為大的$\delta^{15}N$值現象。所以，作物吸收此較大$\delta^{15}N$特徵值之 NH_4^+後表現在植體上 (Turner *et al.* 1983; Natelhoffer & Fry 1988)。

因此，歸納上述各作用之結果，作物之$\delta^{15}N$值會傾向大於其栽培介質或肥料之$\delta^{15}N$值。因本試驗栽培土之 pH 約為 6.6，故 NH_3 揮發作用在本研究中應不明顯。

若定義青江菜與種子之$\delta^{15}N$差值為：

$$\Delta_{Plant\text{-}Seed} = \delta^{15}N_{Plant} - \delta^{15}N_{Seed} \quad (3)$$

且定義青江菜與土壤氮素營養源 (栽培土或肥料) 之$\delta^{15}N$差值為：

$$\Delta_{Plant\text{-}Nutrient} = \delta^{15}N_{Plant} - \delta^{15}N_{Nutrient} \quad (4)$$

表 2 列出四種處理的 $\Delta_{Plant\text{-}Seed}$ 與 $\Delta_{Plant\text{-}Nutrient}$ 值。

由表 2 顯示，除單施用化肥處理之 CF 外，其餘處理之 $\Delta_{Plant\text{-}Seed}$ 與 $\Delta_{Plant\text{-}Nutrient}$ 值均為正值，顯示植體明顯富集 ^{15}N。也就是說，CK、

表 2. 各處理之 $\Delta_{Plant\text{-}Seed}$ 和 $\Delta_{Plant\text{-}Nutrient}$ 值

Table 2. The values of $\Delta_{Plant\text{-}Seed}$ and $\Delta_{Plant\text{-}Nutrient}$ in respective treatments

Treatments	$\Delta_{Plant\text{-}Seed}{}^{z}$ (‰)	$\Delta_{Plant\text{-}Nutrient}{}^{y}$ (‰)
CK	4.2	3.1
OF	17.4	2.1
CF	-1.5	1.1
OC	10.4	1.7

^{z} $\Delta_{Plant\text{-}Seed} = \delta^{15}N_{Plant} - \delta^{15}N_{Seed}$

^{y} $\Delta_{Plant\text{-}Nutrient} = \delta^{15}N_{Plant} - \delta^{15}N_{Nutrient}$

OF、OC 三種處理之青江菜生長均有利用到有機質礦化作用所產生及氮同化作用所形成之 NH_4^+。相對地，化肥為速效性化合物，在土壤環境中氮易溶解為離子態而為作物迅速吸收；因此植物吸收氮所發生之同位素分化作用不若 CK、OF、OC 三種處理般明顯，所以在 CF 中，其 $\Delta_{Plant\text{-}Nutrient}$ 值為 1.1‰，此值較其它處理之值為小 (表 2)，同時化肥之低$\delta^{15}N$ 特徵值 (約為 0‰) 直接反應在植體上。也由於 CF 植體的$\delta^{15}N$ 值反映了化肥的特徵值，造成其小於原種子之$\delta^{15}N$ 值，故 CF 之 $\Delta_{Plant\text{-}Seed}$ 值小於 0‰。

至於 OC 混用有機肥、化肥的情況，其 $\Delta_{Plant\text{-}Seed}$ 值介於 OF 與 CF 之間 (表 2)。假設 OC 中，有機肥與化肥對植體的貢獻度相同，施用肥料的$\delta^{15}N$ 值以有機肥與化肥之$\delta^{15}N$ 值的平均值代表，則 $\Delta_{Plant\text{-}Nutrient}$ 值為 1.7‰ (表 2)；此值也介於 OF 與 CF 之 2.1‰與 1.1‰間 (表 2)。OC 的三重複試驗之$\delta^{15}N$ 值，雖都介於 OF 與 CF 之間，但有二類形態分佈，一為 15‰左右，另一為 7‰左右 (表 1)。造成此現象之原因可能是如果氮素有二種以上來源，作物生長吸取氮素時，可能會受環境條件影響，造成作物對化肥、有機質之氮出現選擇性吸收程度不一的情況。當然，此現象亦可能是其他因素造成，如施肥不均勻、作物生長變異等。

因此，對於是否能以氮同位素分析做為鑑別有機蔬菜之認證技術之一而言，以本試驗之結果顯示初步是可行的：如果在產地上能同時分析植體及所施用之有機肥之$\delta^{15}N$ 值，且植體之$\delta^{15}N$ 值大於有機肥之$\delta^{15}N$ 值 ($\Delta_{Plant\text{-}Nutrient} >$ 0‰) 的條件下，初步可認為此蔬菜是有機蔬菜。相反地，如果全程施用化肥，則蔬菜植體之$\delta^{15}N$ 值會在 0‰左右。然而，要使本同位素方法變成真正可行的驗證技術，則還需有進一步完整的試驗分析與背景數據建立。例如，有眾多型態的有機肥料其$\delta^{15}N$ 特徵值尚待分析建立。再者，如果有混用有機肥、化肥情況，是否能鑑別出摻用化肥的比例；因這涉及在不同環境條件、不同栽種行為下有機質的礦化速率及植體的吸收差異，故需要更完整的試驗設計與分析才能獲得相關訊息。

誌　謝

作者感謝中央研究院環境變遷中心高樹基博士提供質譜儀分析。

引用文獻 (Literature cited)

Brady, N. C. and R. R. Weil 2000. Elements of the Nature and Properties of Soils. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 558 pp.

Deines, P. 1980. The isotopic composition of reduced organic carbon. p.329–406. *in*: Handbook of Environmental Isotope Geochemistry vol. 1. (Fritz, P. and J. Ch. Fontes, eds.) Elsevier, Amsterdam.

Girard, P. and C. Hillaire-Marcel. 1997. Determining the source of nitrate pollution in the Niger discontinuous aquifers using the natural $^{15}N/^{14}N$ ratios. J. Hydrol. 199:239–251.

Gormly, J. R. and R. F. Spalding. 1979. Sources and concentrations of nitrate-nitrogen in ground water of the Central Platte Region, Nebraska. Ground Water 17:291–301.

Högberg, P. 1997. ^{15}N natural abundance in soil-plant system. New Phytol. 137:179–203.

Hübner, H. 1986. Isotope effects of nitrogen in the soil and biosphere. p.361–425. *in*: Handbook of Environmental Isotope Geochemistry, vol. 2. (Fritz, P. and J. Ch. Fontes, eds.) Elsevier, Amsterdam.

Kendall, C. 1998. Tracing nitrogen sources and cycling in catchments. p.517–576. *in*: Isotope Tracers in Catchment Hydrology (Kendall, C. and J. J. McDonnell, eds.) Elsevier, Amsterdam.

Kreitler, C. W. 1979. Nitrogen-isotope ratio studies of soils and groundwater nitrate from alluvial fan aquifers in Texas. J. Hydrol. 42:147–170.

Kreitler, C. W. and D. C. Jones. 1975. Natural soil nitrate: the cause of the nitrate contamination of ground water in Runnels country, Texas. Ground Water 13:1–9.

Lin, J. Y. 1999. The general situation of sustainable agriculture in Taiwan. p.1–35. *in*: Sustainable Agricultural Plants and Reasonable Fertilizing Techniques (Chen, W. S. and J. Y. Lin, eds.)

Chinese Sustainable Agriculture Association and TARI, Taichung. (in Chinese)

Mariotti, A., D. Pierre, J. C. Vedy, S. Bruckert, and J. Guillemot. 1980. The abundance of natural nitrogen 15 in the organic matter of soils along an altitudinal gradient (Chablais, Haute Savoie, France). Catena 7:293–300.

Natelhoffer, K. J. and B. Fry. 1988. Controls on natural nitrogen-15 and carbon-13 abundance in forest soil organic matter. Soil Sci. Soc. Am. J. 52: 1633–1640.

Peng, T. R., T. S. Liu, and H. J. Lin. 2006. Application of stable isotopes in agriculture and environmental studies. J. Taiwan Agric. Res. 55:79–90. (in Chinese with English abstract)

Peng, T. R., W. J. Zhan, Y. W. Lin, and C. L. Liu. 2004. Evaluation of the origin and transformation of nitrate in river water of Nantou area using the nitrogen isotopes in NO_3^-. Soil Environ. 7:167–182. (in Chinese with English abstract)

Turner, G. L., F. J. Bergersen, and H. Tantala. 1983. Natural enrichment of ^{15}N during decomposition of plant material in soil. Soil Biol. Biochem. 15:495–497.

Yoneyama, T. 1996. Characterization of natural ^{15}N abundance of soils. p.205–223. *in*: Mass Spectrometry of Soils (Boutton, T. W. and S. I. Yamasaki, eds.) Marcel Dekker, Inc., New York.

Certification of Organic Vegetable by Analyzing the Nitrogen Isotope Composition of Plant: a Preliminary Evaluation [1]

Tsang-Sen Liu[2], Tsung-Ren Peng[3,4], Sheng-Hong Wu[3], Chia-Hua Fan[3], and Yu-Wen Lin[2]

Abstract

Liu, T. S., T. R. Peng, S. H. Wu, C. H. Fan, and Y. W. Lin. 2009. Certification of organic vegetable by analyzing the nitrogen isotope composition of plant: a preliminary evaluation. J. Taiwan Agric. Res. 58:169–175.

This study was to evaluate whether the isotopic technique can be used as one of the certified methods that discern organic vegetables by analyzing the nitrogen isotope composition ($\delta^{15}N$) of Pak-choi (*Brassica chinensis* L.) and the fertilizer applied. Four fertilization treatments including control (CK), organic fertilizer (OF), chemical fertilizer (CF), and combined use of organic and chemical fertilizers (OC) were performed. The isotopic results indicate the $\delta^{15}N$ value of vegetable has strong relationship with the kinds of fertilizer applied. For example, the vegetable fertilized with organic fertilizer exhibited the high $\delta^{15}N$ value of about 19‰ (OF), which is similar to about 17‰ of organic fertilizer. By contrast, the vegetable fertilized with chemical fertilizer presented the $\delta^{15}N$ value of about 0‰ (CF), which is as low as that of chemical fertilizer. In addition, the integrated result induced from the four treatments infers that this isotopic approach is applicable to discern the organic vegetable on the conditions that the nitrogen isotope compositions of vegetable and the applied organic fertilizer are simultaneously analyzed in the plantation and the $\delta^{15}N$ value of vegetable is greater than that of the applied organic fertilizer. Some further supplementary experiments, however, must be performed to let the isotopic approach be a highly authentic technique.

Key words: Nitrogen isotope, Certification of organic vegetable, Organic and Chemical fertilizers.

---

1. Contribution No.2362 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: July 31, 2009.
2. Respectively, Associate Researcher and Assistant Researcher, Department of Agricultural Chemistry, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Respectively, Associate Professor, Graduate Student, and Research Assistant, Department of Soil and Environmental Sciences, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: trpeng@dragon.nchu.edu.tw; Fax: (04)22859950.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 58(3):176–184 (2009)

甜瓜白粉病菌之繁殖、接種及保存 [1]

黃晉興[2,3] 陳純葳[2] 蘇俊峰[2]

摘 要

黃晉興、陳純葳、蘇俊峰。2009。甜瓜白粉病菌之繁殖、接種及保存。台灣農業研究 58:176–184。

以挑單一孢子的方式可將甜瓜白粉病純化培養於甜瓜葉圓片 (直徑 1.5 cm) 上，於 20–24℃培養 14–16 天可獲得大量可吹落之分生孢子 (4.5 × 10^4–6.8 × 10^4 conidia/leaf disc)，發芽率 24.8–42.3%，而 16℃培養 16–19 天可產生 3.2 × 10^4–3.5 × 10^4 conidia/leaf disc 之分生孢子，發芽率 22.5–33.5%，12 及 28℃產孢量較少且發芽率較低，而 8 及 32℃的環境下無法產孢。以直接吹落分生孢子方式較噴佈分生孢子懸浮液之接種方式為佳，分生孢子發芽率分別為 42.0 及 23.3%，而以 (10 ± 1) conidia/cm^2 的接種源密度接種於盆栽離葉之發病度分別為 70.5 及 44.5%，均有顯著差異。在 24 及 4℃的環境下，白粉病菌分生孢子分別僅能維持 7 或 30 天的活力，在-30℃或液態氮中 (-196℃) 的低溫下，未乾燥之分生孢子均無法存活，而乾燥後的分生孢子持續保存 180 天後，仍可再感染葉圓片。

關鍵詞：甜瓜、白粉病菌、繁殖、接種、保存。

前 言

白粉病是甜瓜 (*Cucumis melo* L.) 主要的真菌病害之一，在台灣甜瓜白粉病主要由 *Podosphaera xanthii* (Castag.) Braun & N. Shish [syn. *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.) Poll; *S. fusca* (Fr.) Blumer emend. Braun] 所引起 (Huang & Wang 2007; Tsay & Tung 1994)。在法國 (Pitrat *et al*. 1998)、美國 (Zitter *et al*. 1996)、以色列 (Cohen *et al*. 1996)、西班牙 (Alvarez *et al.* 2000) 及日本 (Hosaya *et al*. 1999) 等地均有許多 *P. xanthii* 生理小種的報告，在台灣至少有 2 個生理小種，依季節或栽培地區之不同而有不同的生理小種出現，且有時 2 種生理小種同時存在於同一栽培區 (Huang & Wang 2007)。由於瓜類作物白粉病菌是屬於絕對寄生菌 (obligate parasites)，只能利用寄主活體的養分，無法於人工培養基生長及繁殖，故菌株純化培養是進行相關研究的重要關鍵 (Nicot *et al*. 2002)。

利用葉圓片培養白粉病菌的方法廣受使用，主要因為一個葉圓片即可繁殖一個甜瓜白粉病菌分離株，所需要的資材及空間較

---

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2364 號。接受日期：98 年 8 月 4 日。
2. 本所植物病理組助理研究員、聘用助理研究員、助理研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：jhhuang@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302803。

少。除了做為菌株純化培養之外，也可做為抗感病性測定的接種材料 (Bardin *et al*. 1997; Bertrand 1991; Cohen 1993; Epinet *et al*. 1993; Huang *et al*. 2002; Nicot *et al*. 2002)。然而甜瓜葉圓片僅有數週的活力，特別是接種白粉病菌後容易褐化，可能會影響分生孢子的活力，就筆者所知，這方面並未有詳細之相關研究，僅 Bertrand (1991) 以甜瓜子葉培養白粉病菌 *P. xanthii* 及 *Golovinomyces cichoracearum* (D. C.) Huleta 進行研究，其所使用之接種源為於 18–22℃培養 10–14 天的分生孢子。本研究藉由葉圓片進行甜瓜白粉病菌之純化培養及保存方法，探討做為接種源分生孢子之產量及活力，以供相關研究之基礎。

材料與方法

供試作物之栽培、葉圓片及盒栽離葉之製備

將各 IRAN-H 及金輝品種甜瓜之種子置於盛有潮濕濾紙之玻璃培養皿中催芽，待發芽後種植於盛有泥炭土之 5 吋塑膠盆中，於日夜溫 28/22℃光照 12 小時之生長箱中栽培 4–6 週，甜瓜植株長有 4–8 片完全展開葉，取植株之中上位展開葉以自來水洗淨，再經消毒水 (1%次氯酸鈉，並於 200 mL 消毒水加入數滴 Tween-20 界面活性劑攪拌) 表面消毒 1 分鐘，無菌水漂洗 3 次，吸乾游離水，再以經高溫滅菌後之金屬圓柱器具切取直徑 1.5 cm 葉片圓片，正面朝上，置於盛有 2 層濾紙之塑膠培養皿內 (直徑 6 或 9 cm)，添加適量含有 50 ppm tetracyclin 之 M-solution (mannitol 10,000 ppm 及 benzimidazole 30 ppm 之水溶液) 使濾紙完全濕潤並有游離水產生，以維持葉圓片之活力及避免細菌污染影響試驗結果 (Epinet *et al*. 1993; Huang *et al*. 2002)。

取上述於生長箱栽培之金輝甜瓜展開葉，以自來水洗淨，將葉柄插入離葉栽培盒內密封栽培，栽培盒為兩組直徑 14 cm × 高 5.5 cm 之有蓋塑膠盒上下連接，連接層穿孔以供葉柄伸過至下盒，上盒放葉片，下盒盛有未滅菌之 250 mL 地下水，並摻入適量的珍珠石以供葉柄維持伸展、長根及吸收水分。培養初期 2 天保持密閉，爾後於盛有葉片之上盒盒蓋開 2 個直徑 0.5 cm 之小孔以避免水珠累積，於 24–28℃培養 6–10 天可長根，並可維持 2 個月之活力 (Huang & Wang 2007)。

甜瓜白粉病菌菌株之純化培養

於農業試驗所之甜瓜試驗田，取回感染白粉病菌並有分生孢子之甜瓜葉片，於解剖顯微鏡下以單根毛髮夾於竹筷為工具，挑取單一孢子沾黏於上述葉圓片 (IRAN-H 品種)，置於盛有沾濕養液濾紙片之培養皿內 (直徑 6 cm) 進行單孢培養；或以挑針刮取田間甜瓜葉片上的少量分生孢子沾於葉圓片上，待其長出分生孢子後，再以上述方法挑取單一孢子培養。共取 3 塊試驗田，每塊試驗田各取 4 片葉片，每葉片挑取 10 個單孢。每個培養皿內就僅放 1 片葉圓片以繁殖 1 個甜瓜白粉病菌分離株，於 24/20℃ (日夜溫) 光照 12 小時的條件下培養，待葉圓片出現菌落長出分生孢子，再將孢子吹落於另一新鮮葉圓片上，培養大量分生孢子，以菌株編號 Px-001 (*Podosphaera xanthii* race 1，農委會農試驗所植物病理組蔬菜花卉病害研究室) 為爾後試驗之供試菌株。

甜瓜白粉病菌分生孢子發芽率檢測及離葉接種之病害記錄

孢子發芽率檢測：玻片上塗抹溶於丙酮之 2%醋酸纖維 (acetate cellulose, Sigma, USA)，將分生孢子吹佈或噴佈於其上，置於濕室內 (盛有潮濕濾紙之培養皿)，24℃黑暗培養 48 小時後，於顯微鏡下觀察 100 顆分生孢子，記錄其發芽率 (Tsai & Tung 1994)，每處理 3 重複。

離葉接種：將葉圓片繁殖之分生孢子以空氣壓縮機 (air compressor) 釋出之氣體將分生

孢子吹落，或孢子懸浮液以噴霧器噴佈於上盒栽離葉，於旁置放一塊 1 cm^2 之水瓊脂塊計量單位面積之的孢子量，以吹落或噴佈少量而累積數次孢子之方式控制分生孢子濃度於 (10 ± 1) conidia/cm^2，置於日夜溫 24/20℃光照 12 小時之定溫箱培養 12 天後，記錄發病面積佔該盒栽離葉之比例 (%) 視為發病度 (Huang *et al.* 2006)。

溫度與培養時間對白粉病菌培養於葉圓片之孢子數量與活力之影響

接種 50–60 conidia/cm^2 白粉病菌分生孢子於葉圓片上，培養於盛有沾濕養液濾紙之 6 cm 培養皿內，每皿 4 個葉圓片，各於 8、12、16、20、24、28 及 32℃定溫箱培養，並於 6、9、12、14、16、19、22 及 26 天後，每皿取出一個葉圓片以空氣壓縮機釋出之氣體將分生孢子吹落於底部面積 200 cm^2 之圓錐形管座中 (圖 1D–1F)，使其自然落至錐形管座底的 3 片面積 1 cm^2 水瓊脂塊及前述之醋酸纖維玻片上，於顯微鏡下計量該水瓊脂塊之平均孢子量 (每平方公分孢子數)，再乘以 200 cm^2 面積，即為該葉圓片所被吹落的分生孢子量，並於醋酸纖維玻片測發芽率。由於孢子發芽並不代

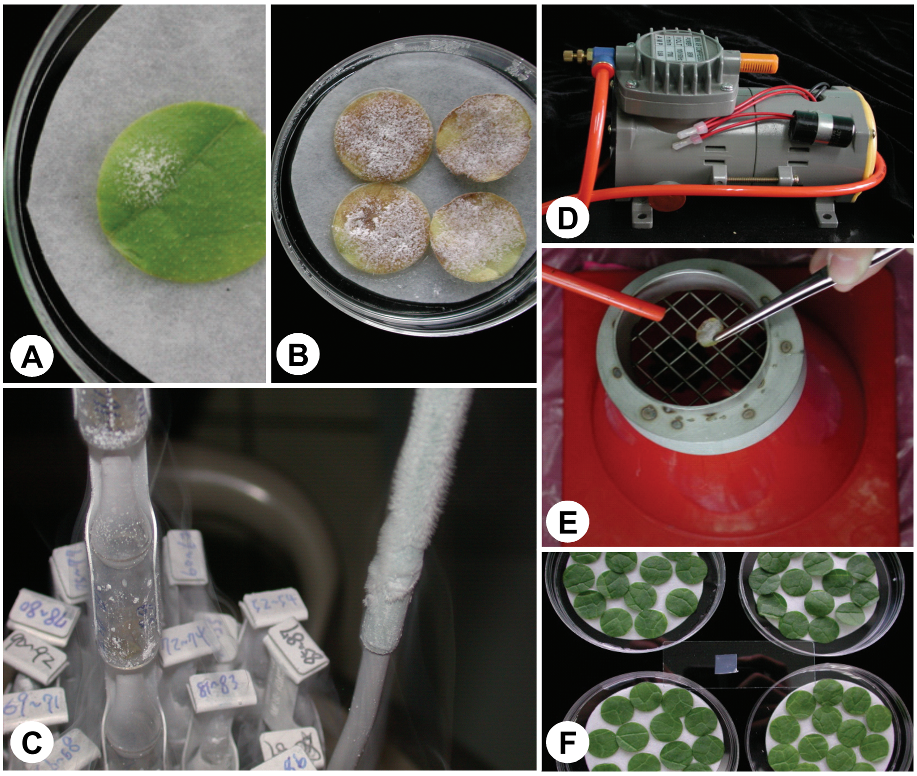


圖 1. 以甜瓜葉圓片單孢培養甜瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* (A)；甜瓜白粉病菌分生孢子吹佈於葉圓片在 24℃培養 16 天產生大量的甜瓜白粉病菌分生孢子(B)；白粉病菌貯放於密封的玻璃安瓶內，保存於液態氮桶中 (C)；利用空氣壓縮機釋出空氣吹散孢子以接種白粉病菌分生孢子 (D、E、F)。

Fig. 1. Single-spore culture of *Podosphaera xanthii* on muskmelon leaf disks (A). Conidia propagation on leaf disks at 24℃ for 16 days with air-blow inoculation (B). Vials of conidia of *P. xanthii* stored in a liquid nitrogen tank (C). Equipment (air compressor) (D, E) used for inoculation of conidia of *P. xanthii* on leaf disks of muskmelon by the air-blow method (F).

表可以順利感染寄主葉片而繁殖，故另需將各處理的孢子進行接種測試，故取 16、20、24 及 28℃培養 14 及 22 天的分生孢子，並以前述方法接種於盆栽離葉記錄發病度，每處理 4 重複 (皿)，相同試驗重複進行一次。

甜瓜白粉病菌之接種方法比較

取上述繁殖有大量白粉病菌分生孢子 (日夜溫 24/20℃，光照 12 小時) 之葉圓片，接種方式為：(1) 直接吹落孢子：於圓椎形管口上方 (底管口直徑 60 cm，上管口直徑 6 cm，高 120 cm) 以加壓氣流將分生孢子吹落於圓椎管內之盆栽離葉；(2) 孢子懸浮液：分生孢子吹落於盛有無菌水之培養皿內獲得孢子懸浮液，以噴霧器噴佈於盆栽離葉。2 種接種方式之接種量皆為 (10 ± 1) conidia/cm^2，置於日夜溫 24/20℃光照 12 小時之定溫箱中，記錄發病度 (Huang *et al*. 2002)，每處理 6 重複，相同試驗重複進行一次。上述方式取得之分生孢子吹佈或噴佈於塗抹有 2%醋酸纖維之玻片上，於顯微鏡下觀察記錄其發芽率，每處理 4 重複，相同試驗重複進行一次。

乾燥與溫度對保存甜瓜白粉病菌菌株之影響

取上述繁殖有大量白粉病菌分生孢子之葉圓片 (日夜溫 24/20℃，光照 12 小時培養 14–16 天)，切成寬 2 mm 之條狀片，置於內盛無水硫酸銅之乾燥箱乾燥 2 天 (室溫 24–28℃)，或未經乾燥過程，再置於 2 mL 玻璃安瓶內，以高溫氫氧火焰將瓶口密封，分別於 24、4 及 -30℃定溫箱與盛有液態氮之鋼桶內保存，在保存後 7、14、30、60 及 180 天，取出甜瓜葉條狀片以前述方法於醋酸纖維玻片測發芽率。由於孢子發芽並不代表可以順利感染寄主葉片而繁殖，故另需將各保存處理的孢子進行感染繁殖的測試，取同瓶甜瓜葉條狀片上的分生孢子沾抹於前述方法之葉圓片上，每個葉圓片約可沾有該葉條片上 500–1000 個分生孢子，測試是否可生長產生菌落，每個處理 4 重複，相同試驗重複進行一次。

結　果

甜瓜白粉病菌菌株之純化與培養

以夾於竹筷的毛髮為工具，較金屬挑針較易挑取單一孢子進行菌株純化培養，將單一孢子置於葉圓片上培養，但並非每一單孢皆能長出菌落，數次的單孢培養過程中，若直接挑取田間甜瓜葉片上的白粉病菌分生孢子，每塊試驗田之葉片取樣可長出菌落的比率為 0–15%，但先培養於葉圓片再挑單孢培養則每塊試驗田之葉片取樣可長出菌落的比率為 20–50%。

溫度與培養時間對白粉病菌培養於葉圓片之孢子數量與活力之影響

由表 1 數據顯示，最適合甜瓜白粉病菌分生孢子繁殖之溫度為 20–24℃，8 及 32℃於試驗過程中皆未見產生孢子。以孢子吹落法將白粉病菌分生孢子繁殖在葉圓片上，在 20 或 24℃溫度環境中，9 天後即獲得大量分生孢子 (可吹落之分生孢子)，分別為 1.9×10^3 或 7.1×10^3 conidia/leaf disc，14–16 天後孢子量即達到高點，分別約為 4.4×10^4–4.5×10^4 或 5.3×10^4–6.8×10^4 conidia/leaf disc，而發芽率以培養 14 天最高，分別為 33.0 或 42.3%，爾後孢子量不再增加，甚至孢子黏於褐化崩腐之葉圓片不易吹落，孢子發芽率則持續降低，於 26 天後，發芽率分別為 8.0 及 0.0%。16℃環境則於第 9 天產生可吹落的分生孢子，16–19 天孢子量最多 (3.2×10^4–3.5×10^4 conidia/leaf disc) 且發芽率達 22.5–35.0%，26 天後發芽率仍有 10.3%。28℃環境下亦於 9 天後開始有可吹落之孢子，孢子量或發芽率最高為培養 14 天之 1.1×10^4 conidia/leaf disc 或 21.3%。12℃遲至 16 天產孢，而孢子量亦

表 1. 溫度及培養時間對甜瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 於甜瓜葉圓片繁殖之分生孢子量及孢子活力之影響
Table 1. Effect of temperature and culture period on sporulation and vitality of conidia of *Podosphaera xanthii* cultivated on leaf disks of muskmelon

Incubation time (d)	Conidia/leaf disc [z] (Germination rate %) [y]						
	Temperature (℃)						
	8	12	16	20	24	28	32
3	0 (ND)	0 d [x](ND)	0 c (ND)	0 e (ND)	0 f (ND)	0 c (ND)	0 (ND)
6	0 (ND)	0 d (ND)	0 c (ND)	0 e (ND)	480 f (ND)	0 c (ND)	0 (ND)
9	0 (ND)	0 d (ND)	280 c (ND)	1880 de (10.2 d)	7140 ef (34.8 a)	5230 b (12.0 b)	0 (ND)
12	0 (ND)	0 d (ND)	2260 c (8.5 d)	8940 cd (16.8 bcd)	16640 d (41.0 a)	6895 ab (15.8 ab)	0 (ND)
14	0 (ND)	0 d (ND)	10140 b (32.5 a)	44620 a (33.0 a)	53300 b (42.3 a)	10985 a (21.3 a)	0 (ND)
16	0 (ND)	160 cd (ND)	31880 a (33.5 a)	45000 a (25.5 ab)	68000 a (24.8 b)	10415 a (17.8 a)	0 (ND)
19	0 (ND)	540 c (ND)	35000 a (22.5 b)	46760 a (21.3 bc)	53940 b (15.3 c)	7615 ab (15.8 ab)	0 (ND)
22	0 (ND)	2260 b (12.5 a)	28100 a (18.3 bc)	31200 b (14.0 cd)	38135 c (4.7 d)	4435 b (3.0 c)	0 (ND)
26	0 (ND)	2850 a (11.0 a)	13750 b (10.3 cd)	16050 c (8.0 d)	13350 de (0.0 d)	3670 bc (0.0 c)	0 (ND)

[z] The mean value of conidia number of one leaf disc.
[y] The germination rates on acetate-cellulose glass slide were examined after 48 h at 24℃.
[x] Means followed by the same letters within each column are not significantly different at $p < 0.05$ according to the LSD Test.

不多，僅於培養 22–26 天之處理中產生 2.3 × 10^3–2.9 × 10^3 conidia/leaf disc，發芽率最高僅 12.5%。將於 16、20、24 及 28℃培養 14 及 22 天的分生孢子接種於盒栽離葉上 (接種量皆為 (10 ± 1) conidia/cm^2)，發現 20、24 及 28℃培養 22 天之孢子較 14 天之孢子發芽率低且造成病害輕，而 16℃培養 22 天之孢子較 14 天之孢子發芽率低但發病度無顯著差異 (表 2)。

甜瓜接種白粉病菌菌株之方法比較

以直接吹落分生孢子方式獲得之接種源與噴佈分生孢子懸浮液比較，分生孢子發芽率分別為 42.0 與 23.3%，而分別接種於盒栽離葉之發病度為 70.5 及 44.5%，均有顯著差異 ($p < 0.05$)。

乾燥與溫度對保存甜瓜白粉病菌菌株之影響

表 3 的結果顯示，新鮮的甜瓜白粉病菌分生孢子的發芽率為 36.7%，而乾燥後則僅為 4.5%，在常溫 (24℃) 的環境下，以葉圓片所培養的甜瓜白粉病菌孢子無論新鮮或經過乾燥處理，7 天後雖發芽率低 (0.3–1.3%)，但將該處理之分生孢子沾於新鮮葉圓片 (500–1000 conidia/leaf disc) 可順利感染而繁殖，然而第 14 天皆失去活力，無法發芽，也無法感染、繁殖於新鮮葉圓片，而 4℃處理分生孢子之活力則可延長至 30 天；在-30℃或液態氮中的低溫下，新鮮孢子均無法存活，然而乾燥後的孢子持續保存 180 天後，部分孢子仍有活力，可再感染新鮮葉圓片。

討　論

建立純化接種源的製備體系，最方便的方法即是選取白粉病單一菌落，挑取該菌落之孢子於新鮮葉片上培養 (single-colony culture) 以純化菌株 (Moseman *et al*. 1965; O’Brien *et al*. 1988; Huang *et al*. 1995)，亦有學者利用挑取單一孢子串培養 (single-conidial-chain culture)

表 2. 以葉圓片於不同溫度及培養時間下所繁殖之甜瓜白粉病菌 *Podosphaera xanthii* 分生孢子對接種於甜瓜盒栽離葉白粉病之影響

Table 2. Effect of incubation period and temperature on conidia germination and pathogenicity of *Podosphaera xanthii* harvested from leaf disks of muskmelon

	Conidia germination % [z] (Disease severity % on detached leaves) [y]			
	Conidia culture temperature (℃)			
Culture days	16	20	24	28
14	32.5 a [x] (73.0 a)	33.5 a (81.7 a)	42.3 a (83.3 a)	21.3 a (31.3 a)
22	18.3 b (68.3 a)	14.0 b (25.0 b)	4.7 b (15.0 b)	3.0 b (2.3 b)

[z] The germination rates on acetate-cellulose glass slide were examined after 48 h at 24℃.
[y] The disease severity on detached leaves was calculated 12 days after inoculating with surveyed on detached leaves which inoculated with approximate 10 conidia/cm^2 of *Podosphaera xanthii*. The ratio of patch area on the detached leaves caused by the pathogen were surveyed as the disease severity.
[x] Means followed by the same letters within each column are not significantly different at $p < 0.05$ according to the LSD Test.

表 3. 保存溫度、時間及保存時的孢子乾濕狀態對孢子活力之影響

Table 3. Effect of sources of conidia, storage temperature, and storage period on viability of conidia of *Podosphaera xanthii*

		Conidia germination rate (%) [z]					
		Storage period (d)					
Storage condition	Source of conidia	0	7	14	30	60	180
24℃	Fresh	36.7 a [y]	1.3 bc	0.0 d	0.0 c	0.0 b	0.0 c
	Dry	4.5 b	0.3 c	0.0 d	0.0 c	0.0 b	0.0 c
4℃	Fresh	-	8.7 a	4.7 a	3.7 a	0.0 b	0.0 c
	Dry	-	0.7 c	1.7 c	0.3 c	0.0 b	0.0 c
-30℃	Fresh	-	0.0 c	0.0 d	0.0 c	0.0 b	0.0 c
	Dry	-	2.7 b	2.6 b	1.7 b	3.0 a	2.0 b
N_2 (L)	Fresh	-	0.0 c	0.0 d	0.0 c	0.0 b	0.0 c
	Dry	-	2.7 b	2.1 bc	2.3 b	2.7 a	3.0 a

[z] The germination rates on acetate-cellulose glass slide were examined after 48 h at 24℃.
[y] Means followed by the same letters within each column are not significantly different at $p < 0.05$ according to the LSD Test.

來達到菌系純化的目的 (Smith 1970; Evans *et al*. 1996)；連續數次的單一菌落分離雖可達到菌株純化的效果，但仍未能如單一孢子培養 (single-spore culture) 進行純化菌株較佳 (Bertrand 1991; Huang & Wang 2007; Nicot *et al*. 2002)。本研究在蒐集田間甜瓜白粉病菌菌株時，直接取回病葉於顯微鏡下挑取單孢培養於葉圓片上，有時無法培養出菌落，推測其原因可能為直接從田間葉片所挑取之白粉菌單孢活力已喪失，或極易摻雜其他微生物而不易純化培養；若先將田間甜瓜白粉病菌孢子塗抹培養於葉圓片上，待長出新的分生孢子後，再挑單孢培養，則較容易獲得菌落，然而所使用之葉圓片應對所有 *Podosphaera xanthii* 生理小種皆感病之品種，如 IRAN-H，或較無抗病性的甜瓜子葉 (Bertrand 1991)，才能避免漏失田間確實存在的生理小種。

本研究發現不同溫度及不同培養時間的條件下，甜瓜白粉病菌分生孢子的產量與發芽率有所不同，16–24℃為繁殖分生孢子的最適合溫度，最高可繁殖 6.8 × 10^4 conidia/leaf disc 可吹落接種之分生孢子量 (表 1)，若培養天數超過 22 天孢子易黏著於褐化崩腐之葉圓片上而不易吹落，且發芽率降低，不易感染葉片造成病斑 (表 2)，這些失去活力的孢子相信與其年齡有關 (Nicot *et al*. 2002)，故試驗所使用的甜瓜白粉病菌分生孢子應予以固定其繁殖條件，本研究於 20–24℃培養 14–16 天或 16℃培養 16–19 天可獲得大量發芽率高之分生孢子 (3.2 × 10^4–6.8 × 10^4 conidia/leaf disc，發芽率 22.5–42.3%)，為爾後試驗的接種源來源 (表 1)。有報告指出 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* 與 *Golovinomyces cichoracearum* 年齡 1 日的分生孢子發芽率可達 80%，若混雜生長 5–8 日的分生孢子則發芽率降為 18–68% (Sommers & Horsfall 1966)，顯示新鮮的分生孢子發芽率較高，而本試驗所測試的甜瓜白粉菌為培養數日的孢子，如24℃培養14天之分生孢子為第9–14天產生分生孢子的集合，孢子發芽率可能較低。

以乾孢子吹佈於寄主表面為最貼近自然感染的接種方法，於錐形塔物頂端散佈分生孢子較能使接種源均勻散佈 (Bertrand & Pitrat 1989; Epinat *et al*. 1993)，但不易事先精準預估接種量 (Epinat *et al*. 1993)，即使很小心的估算也會有少許的誤差 (Huang *et al*. 2006)。故有學者以孢子懸浮液來接種 (Bohn & Whitaker 1964; Reeser *et al*. 1983)，不過本研究與文獻顯示水會降低甜瓜白粉病菌之孢子發芽率及病勢發展 (Sivapalan 1993; Yarwood 1978)，故筆者認為孢子懸浮液不適合用於甜瓜白粉病菌的接種。

白粉病菌的分生孢子或菌絲在無活寄主組織的條件下不易存活，故一旦分生孢子脫離活寄主不久後即失去活力，本研究的結果顯示，分生孢子保存於密封的安瓶內，在 24 或 4℃的環境下，分生孢子的活力僅能分別維持 7 或 30 天左右，且以未經乾燥的分生孢子較易再繁殖，然而要長期保存則需於低溫下，即使無抗凍劑的保護，貯於密封安瓶內之乾燥分生孢子於-30℃或液態氮中 (-196℃)，於 180 天後仍具有活力，但未乾燥之分生孢子則無法於-30℃或液態氮中保存 (表 3)。許多學者也以低溫 (-70℃) 或液態氮來保存白粉病菌 (Dahmen *et al*. 1983; O’Brien & Wienert 1994; Stummer *et al*. 1999)，筆者亦有保存超過 2 年之甜瓜白粉病菌菌株仍具可再繁殖的活力，故乾燥的甜瓜白粉病菌可貯放於密封的安瓶內而長期保存於液態氮中，雖然發芽率均低於 3%，但取出 500–1000 個分生孢子沾於葉圓片上，均能順利繁殖。

引用文獻 (Literature cited)

Alvarez, J. M., M. L. Gomez-Guillamon, N. A. Tores, I. Canovas, and E. Floris. 2000. Virulence differences between two Spanish isolates of *Sphaerotheca fuliginea* race 2 on melon. Acta Hortic. 510:67–69.

Bardin, M., P. C. Nicot, P. Normand, and J. M. Lemaire. 1997. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits. Eu. J. Plant Pathol. 103:545–554.

Bertrand, F. 1991. Les Oidiums des Cucurbitacees: Maintien en Culture Pure, Etude de Leur Variabilite et de la Sensibilite Chez le Melon. Ph. D. thesis. University of Paris XI. Rrsay, France. 259 pp. (in French with English abstract)

Bertrand, F. and M. Pitrat. 1989. Screening of a muskmelon germplasm for susceptibility to 5 pathotypes of powdery mildew. p.140–142. *in*: Cucurbitaceae 89: Evaluation and Enhancement of Cucurbit Germplasm. (Thomas, C. E., ed.) Dep. Agric., Agric. Res. Serv., Charleston S. C., France.

Bohn, G. W. and T. W. Whitaker. 1964. Genetics of resistance to powdery mildew race 2 in muskmelon. Phytopathology 54:587–591.

Cohen, R. 1993. A leaf disk assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. Plant Dis. 77:513–517.

Cohen, R., N. Katzir, S. Schreiber, R. Greenberg, and O. Yarden. 1996. Occurrence of *Sphaerotheca fuliginea* race 3 on cucurbits in Israel. Plant Dis. 80:344.

Dahmen, H., T. Staub., and F. J. Schwinn. 1983. Tehcnique for long-term preservation of phytopathogenic fungi in liquid nitrogen. Phytopathology 73: 41–246.

Epinet, C., M. Pitrat, and F. Bertrand. 1993. Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildew. Euphytica 65:135–144.

Evans, K. J., D. L. Whisson, and E. S. Scott. 1996. An experimental system for characterizing isolates of *Uncinula necator*. Mycol. Res. 100:675–680.

Hosaya, K., K. Narisawa, M. Pitrat, and H. Ezura. 1999. Race identification in powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) on melon (*Cucumis melo*) in Japan. Plant Breed. 118:259–262.

Huang, J. H. and Y. H. Wang. 2007. The races of *Podosphaera xanthii* caused melon powdery mildew in Taiwan. J. Taiwan Agric. Res. 56: 307–315. (in Chinese with English abstract)

Huang, J. H., C. T. Lo, and T. F. Hsieh. 2006. Disease assessment of powdery mildew on melon with cultured leaf method. J. Taiwan Agric. Res. 55: 91–100. (in Chinese with English abstract)

Huang, J. H., Y. H. Wang, and C. T. Lo. 2002. Development of leaf-disk method for screening melon varieties resistant to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. J. Agric. Res. China 51:49–56. (in Chinese with English abstract)

Huang, J., J. Kranz, and H. G. Welz. 1995. Selection of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in pure culture and mixed strands of spring barley. Plant Pathol. 43: 458–470.

Moseman, J. G., R. C. F. Macer, and L. W. Greeley. 1965. Genetic studies with cultures of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* virulent on *Hordeum spontaneum*. Trans. Br. Mycol. Soc. 48:479–489.

Nicot, P. C., M. Bardin, and A. J. Dik. 2002. Basic methods for epidemiological studies of powdery mildews: culture and preservation of isolations, production and delivery of inoculum, and disease assessment. p.83–99. *in*: The Powdery Mildews- A Comprehensive Treatise. (Belanger, R. R. *et al*. ed.) APS Press.

O'Brien, R. G. and M. Wienert. 1994. A storage technique for cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*). Aust. Plant Pathol. 23:86–87.

O'Brien, R. G., L. L. Vawdrey, and J. L. Glass. 1988. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) and its effect on field control. Aust. J. Exp. Agric. 28:417–423.

Pitrat, M., C. Dogimont, and M. Bardin.1998. Resistance to fungal diseases of foliage in melon. Cucurbitaceae 98:167–173.

Reeser, P. W., D. J. Hagedorn, and D. I. Rouse. 1983. Quantitative inoculations with *Erysiphe pisi* to assess variation of infection efficiency on peas. Phytopathology 73:1238–1240.

Sivapalan, A. 1993. Effects of water on germination of powdery mildew conidia. Mycol. Res. 97:71–76.

Smith, C. G. 1970. Production of powdery mildew cleistocarps in a controlled environment. Trans. Br. Mycol. Soc. 55:355–365.

Sommers, E. and J. G. Horsfall. 1966. The water content of powdery mildew conidia. Phytopathology 56:1031–1035.

Stummer, B. E., T. Zanker, and E. S. Scott. 1999. Cryopreservation of air-dried conidia of *Uncinula necator*. Aust. Plant Pathol. 28:82–84.

Tsay, J. G. and B. K. Tung. 1994. Powdery mildew of cucurbit crops. p.135–146. *in* the Proceeding of Symposium on Techniques of Cucurbits Protection. Plant Protection Society of the Republic of China. Taichung, Taiwan, ROC. (in Chinese with English abstract)

Yarwood, C. E. 1978. Water stimulates Sphaerotheca. Mycologia 70:1035–1039.

Zitter, T. A., D. L. Hopkins, and C. E. Thomas. 1996. Compendium of Cucurbit Disease. APS. USA. 87 pp.

Propagation, Inoculation and Preservation of *Podosphaera xanthii* Caused Muskmelon Powdery Mildew [1]

Jin-Hsing Huang[2,3], Chun-Wei Chen[2], and Junn-Feng Su[2]

Abstract

Huang, J. H., C. W. Chen, and J. F. Su. 2009. Propagation, inoculation and preservation of *Podosphaera xanthii* caused muskmelon powdery mildew. J. Taiwan Agric. Res. 58:176–184.

Single conidium of *Podosphaera xanthii*, causal agent of powdery mildew of muskmelon, were isolated from colonies on diseased leaves and cultured on the leaf disks of muskmelon for purification and production of conidia. The range of optimum temperature for production and germination of conidia of *P. xanthii* was 20 to 24℃. When conidia were inoculated on the leaf disks (1.5 cm in diam.) by the air-blow method and incubated at 20 or 24℃ for 14–16 days, the fungus produced 4.5×10^4–6.8×10^4 conidia/leaf disc with the germination rates of 24.8–42.3%. When the inoculated leaf disks were incubated at 16℃ for 16–19 days, the number of conidia produced (3.2×10^4–3.5×10^4 conidia /leaf disc) and the rate of conidia germination (22.5–33.5%) were highest at the temperature. The conidia number and germination rate were low for the cultures incubated at 12 or 28℃. The cultures failed to produce conidia on the leaf disks incubated at 8 or 32℃ for 14–16 days or longer. Inoculation of conidia of *P. xanthii* on leaf disks of muskmelon by the air-blow method was more effective than the spraying method using conidia suspensions. The germination rates and disease severity were 23.3% and 42.0%, respectively, for the inoculation method of conidia suspensions, compared with 44.5% and 70.5% for the inoculation of air-blow conidia. Fresh conidia remained viable for 7 days at 24℃ and 30 days at 4℃ but they were unable to survive by storing at -30℃ or in liquid nitrogen. However, air-dried conidia stored at -30℃ or in liquid nitrogen survived for at least 180 days.

Key words: Melon, *Podosphaera xanthii*, Powdery mildew, Propagation, Inoculation, Preservation.

---

1. Contribution No.2364 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: August 4, 2009.
2. Assistant Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan.
3. Corresponding author, e-mail: jhhuang@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 58(3):185–195 (2009)

利用中和後之亞磷酸溶液防治馬鈴薯與番茄晚疫病[1]

蔡志濃[2] 安寶貞[2,3] 王姻婷[2] 王馨媛[2] 胡瓊月[2]

摘　要

蔡志濃、安寶貞、王姻婷、王馨媛、胡瓊月。2009。利用中和後之亞磷酸溶液防治馬鈴薯與番茄晚疫病。台灣農業研究 58:185–195

將亞磷酸 (phosphorous acid, H_3PO_3) 的水溶液以等重 (1:1, w/w) 的氫氧化鉀 (potassium hydroxide, KOH) 中和後配製成亞磷酸-氫氧化鉀中和液 (neutralized phosphorous acid solution, 簡稱 NPA)，來測定其對晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 與晚疫病的抑制能力。在 rye B 培養基上，NPA 於高濃度 1000 mg/L 下可以完全抑制所有供試菌株之菌絲生長與胞囊發芽；當濃度 100 mg/L 時，NPA 對菌絲生長與胞囊發芽之抑制率分別為 21.1% 與 69.9%；但在低濃度 10 mg/L 時，則完全無抑制作用。1999–2000 年之田間實驗結果顯示，當病害初發生時，將濃度 1000 mg/L 之 NPA 噴施於馬鈴薯 ‘克尼伯’品種與番茄 ‘農友 301’品種，每隔 7 天施用 1 次，連續 2 次後即可顯著降低晚疫病的罹病度，病害防治率分別為 30.1%與 36.8%，施用 4 次後防治率分別為 65.2 與 58.3%。2004 年冬季至 2005 年春季在農試所番茄試驗田進行 3 次試驗，1000 mg/L 之 NPA 施用 3 次後，停用 3 星期，亦可明顯降低番茄 (‘農友’ 與 ‘聖女’ 品種) 晚疫病的罹病度 40–60%，進而減緩病害之病勢進展。但在連續降雨季節，NPA 在 1000 mg/L 的濃度下降低罹病度僅有 20–40%，無法有效壓抑晚疫病。

關鍵詞：亞磷酸、晚疫病、馬鈴薯、番茄、病害防治。

前　言

晚疫病是國際間馬鈴薯及番茄的重要病害，由 *Phytophthora infestans* de Bary 引起，在 18 世紀曾經造成歐洲愛爾蘭嚴重飢饉 (Semal 1995)。該病害於 1980 年代捲土重來，造成重大經濟損失。在台灣，晚疫病於 1908 年即有記載 (Kawakami & Suzuki 1908; Sawada 1919)，但 1997 年以前在台灣甚少發生 (Ann *et al.* 1998)，但自 1997 年 12 月起，台中后里馬鈴薯田爆發嚴重晚疫病，疫情快速向外蔓延至全台之馬鈴薯與番茄田，造成十分重大之經濟損失 (Ann *et al.* 1998; Ann & Chang 2000)。之後，研究顯示台灣晚疫病之嚴重發生係由新菌系 US11 入侵的結果 (Jyan *et al.* 2004)。又因番茄為連續開花結果的作物，採收

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2365 號。接受日期：98 年 8 月 10 日。
2. 本所植物病理組副研究員、研究員兼組長、研究助理、研究助理、研究助理。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 通訊作者，電子郵件：pjann@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302803。

期間施用化學農藥，易有農藥殘毒污染之虞，尋求安全之非農藥防治製劑實有必要。

近年來國外發現亞磷酸 (phosphorous acid) 對卵菌 (Oomycetes) 引起的病害有良好的防治功效 (Pegg *et al*. 1985; Cohen & Coffey 1986; Mckay & Floyd 1992; Johnson *et al.* 2004)。但因亞磷酸為強酸，水溶液的酸鹼值約為 pH 2–3，無法直接使用，必須以鹼性物質中和後，才能施用於植物體；而且亞磷酸溶於水後易氧化成磷酸而失效，後經本所多年試驗，已經研發出一種非常簡單配製亞磷酸溶液的方法 (Ann *et al.* 2000)，且已技術轉移 (農試所技術轉移案 No.9, 2006)，使用者可以自行配製。在初步試驗中發現連續使用稀釋 1000 倍的亞磷酸中和液，可以明顯降低晚疫病的發生，在此介紹此中和後之亞磷酸溶液在田間防治馬鈴薯與番茄晚疫病的成效。

材料與方法

供試晚疫病菌株與接種原製備

試驗室測試用之晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 菌株共 5 支，均為 1998 年分離自田間罹病組織，分別為 p98001 分離自台中后里馬鈴薯田、p98029 自雲林斗南馬鈴薯田、p98061 與 p98063 來自本所番茄田，及 p98096 自嘉義白河番茄田。各供試菌株培養於 rye B agar (Caten & Jinks 1968)，置於 20℃下無光照培養 10–14 天，至形成足夠之胞囊後，每皿加入 20 mL 無菌水，將胞囊洗下，並將濃度調節至 500–1000 sporangia/mL 供試。

亞磷酸-氫氧化鉀中和水溶液之備製

實驗室使用之亞磷酸 (Phosphorous acid) 為一白色透明結晶狀之高純度試藥級產品 (H_3PO_3, 99% white crystal, Aldrich Co.)，而中和亞磷酸用之氫氧化鉀 (potassium hydroxide) 為白色扁圓形顆粒狀之試藥級產品 (≧85% KOH pellet GR, Merck Co.)。田間試驗之亞磷酸為工業級產品，白色透明結晶 (92–95% H_3PO_3, white crystal)，進口自日本曹達公司 (Nippon Soda Company, Japan)，而中和用之氫氧化鉀購自同一公司，白色薄片狀之工業級產品 (≧85% KOH, white, thin piece)。兩種化學品均置於褐色玻璃瓶中，以蠟膜 (parafilm) 密封，避免與空氣接觸後易潮解與氧化。

調製亞磷酸中和溶液前，先計算稀釋倍數所需的亞磷酸重量，再稱取等重量之亞磷酸與氫氧化鉀藥品；調製時先將亞磷酸加入全量的蒸餾水中，攪拌完全溶解後，再加入氫氧化鉀溶解，中和後的亞磷酸-氫氧化鉀溶液 (簡稱 NPA, neutralized phosphorous acid solution) 於調製完成後立即使用。田間試驗時，分別稱取等重量之亞磷酸與氫氧化鉀藥品，於田間先溶解亞磷酸再溶解氫氧化鉀，並立即將中和後之 NPA 噴布於田間植株上。中和後的 NPA 在濃度 1000 mg/L 下的酸鹼值約為 pH 6.3 (試藥級產品) 與 6.7 (工業級產品) (Ann *et al.* 2000)。

其他供試之化學合成農藥

實驗中使用之化學合成農藥包括：80%福賽得可濕性粉劑 (Fosetyl-aluminum WP)、35%依得利可濕性粉劑 (Etridiazole wp)、35%滅達樂可濕性粉劑 (Metalaxyl WP) 及 50%達滅芬可濕性粉劑 (Dimethomorph) 等。

亞磷酸與其他供試藥劑於培養基上對晚疫病菌菌絲生長與胞囊發芽之抑制能力測定

配製各種藥劑與濃度，使加入 rye B agar 後成為有效濃度 (a.i.) 分別為 10、100、1000 mg/L，再倒入直徑 9 cm 的塑膠培養皿內，每皿約 20 mL。培養供試菌株，將生長在 rye B agar 5–7 天的菌落，以滅菌打孔器 (內徑 6 mm) 切取菌落邊緣，移殖於含有藥劑的培養皿 3/4 處，放置於 20℃無光照定溫箱內，7 天後量取菌落半徑，測定各藥劑對晚疫病菌菌絲生長之抑制情形。此外，將配置好之

胞囊懸浮液 5 滴 (約含 100–200 胞囊) 滴於含不同濃度藥劑的培養皿上，以無菌玻璃棒抹平後，放置於 20℃無光照定溫箱內，48 小時後計算胞囊發芽率，發芽管長度在 100 µm 以上者為有效發芽胞囊，每皿隨機計算 100 胞囊。對照處理為無添加藥劑者相比較，每菌株每處理 4 培養皿，實驗至少重複 2 次。

亞磷酸於田間防治馬鈴薯晚疫病

在先期試驗中發現 NPA 防治植物地上部之病害時，以葉面噴施之效果較佳，且濃度在 1000 mg/L 以下時較不會引起藥害 (Ann *et al.* 2000)，因此田間試驗選用之 NPA 濃度為 1000 mg/L，且以葉面噴布之方式行之。

自 1998 年 12 月至 1999 年 3 月於台中后里馬鈴薯試驗田進行病害試驗，馬鈴薯栽培品種為克尼伯 (*Solanum tuberosum* var. ‘Kennebec’，俗稱大葉種)，行距 60 cm，株距 15 cm，每畦兩行。田間試驗採逢機完全區集設計 (randomized complete block design, RCBD)，每處理 3 重複，每重複 24 株。NPA 與其他供試藥劑 [包括 80% 福賽得可濕性粉劑 (稀釋 200 倍)、35%依得利可濕性粉劑 (稀釋 1000 倍) 及 50%達滅芬可濕性粉劑 (稀釋 4000 倍)]，依田間推廣濃度 (Fei & Wang 2007) 於當地開始出現晚疫病時開始噴藥，每 7 天施用 1 次，連續 4 次。病害調查，噴施 NPA 前 1 天，第 2 次與第 4 次施用後 7 天各調查病害 1 次。調查時，每小區調查中間之 20 株，每株調查罹病級數 (disease index)，計算小區罹病度 (disease severity)。罹病級數分 5 等級：0 = 完全無晚疫病病斑；1 = 每株病斑在 5 個斑點以下；2 = 每株病斑 5 個斑點以上，但健康組織面積佔全株面積 2/3 以上，且萎凋情形 1/3 株以下；3 = 健康組織面積佔全面積 1/3–2/3 之間，或 1/3–2/3 株萎凋；4 = 健康組織面積佔全面積 1/3 以下，或 2/3 株以上萎凋。罹病度 = Σ (罹病級數 × 該等級罹病株數)/(4 × 總調查株數) × 100%。

亞磷酸於田間防治番茄晚疫病

自 1998 年 12 月至 1999 年 4 月於農試所番茄試驗田進行晚疫病防治試驗。供試品種為大果番茄 ‘農友 301’ (*Lycopersin esculentum* var. known-you 301)，先在溫室內播種番茄種子，待萌芽後移植到穴盤內育苗 1–1.5 月，至幼苗株高 20–30 cm 時，於 12 月 1 日移植於本田，行距 100 cm，株距 30 cm，每畦 2 行。田間試驗亦採 RCBD，每處理 3 重複，每重複 24 株。施藥處理、施藥方法、病害調查及統計分析均與馬鈴薯試驗相同。

亞磷酸對田間番茄晚疫病病勢進展之影響

自 2004 年 12 月至 2005 年 4 月於農試所番茄試驗田進行試驗，供試番茄除‘農友 301’外，尚包括小果番茄 ‘聖女’，分別於 12 月 2 日、12 月 30 日及 2 月 1 日分 3 次將番茄幼苗種植於田間，處理僅包括 NPA 與無施用對照處理，每畦 2 行共 50 株為 1 處理，每處理 2 重複。94 年 1 月 13 日田間晚疫病開始發生，1 月 15 日開始每週噴灑 1000 mg/L NPA 一次，連續 3 次，相隔 3 週後再連續每週噴灑 1000 mg/L NPA，共 3 次。2 月 1 日移植者第 2 天即開始施用 NPA，連續 3 次，相隔 3 週後再連續施用 3 次。對照處理則無噴施任何防治晚疫病之藥劑。植物種植後，每星期調查病害 2 次，至對照區死亡或病害不再進展為止。

統計分析方法

先進行變方分析 (ANOVA)，再以最小顯著差異性 (Fisher’s least significant difference, LSD) 測驗，分析各處理在 1%顯著水準下之差異。

結　果

亞磷酸與其他供試藥劑在培養基上對晚疫病菌菌絲生長與胞囊發芽之抑制能力

供試藥劑對晚疫病菌菌絲生長之抑制能力如表 1 所示。NPA 在濃度 1000 mg/L 時，可以

完全抑制菌絲生長；但在 10 mg/L 與 100 mg/L 時，NPA 之抑制效果很差，抑菌率不到 20%。福賽得與滅達樂的抑菌效果與 NPA 相仿。依得利在濃度 100 mg/L 與 10 mg/L 時抑菌能力不佳，但在 1000 mg/L 時，則可完全抑菌。抑菌效果最佳者為達滅芬，在較低濃度 10 mg/L 時即可完全抑制晚疫病菌之菌絲生長。

供試藥劑對晚疫病菌胞囊發芽之抑制能力如表 2 所示。供試菌株均能正常產生胞囊，但胞囊發芽能力很差，發芽率 20–33%，平均 26.5%，約有 3/4 的胞囊不會發芽。NPA 於濃度 10 mg/L 時，在培養基上無法抑制胞囊發芽，發芽率亦為 26.5%；但在濃度 1000 mg/L 時，可以完全抑制胞囊發芽。福賽得、滅達樂及依得利在濃度 10 mg/L 時，不但無抑制胞囊發芽的效果，反而會促進發芽，胞囊發芽率比對照處理高 1.35–2.12 倍；這 3 種藥劑在濃度 100 mg/L 時，則有強弱不等之抑制能力。達滅芬為供試藥劑中抑制胞囊發芽效果較佳者，在供試濃度 10–1000 mg/L 下均有抑制作用，抑制率 80%以上。

表 1. 中和後之亞磷酸 (NPA) 與不同化學殺菌劑對晚疫病菌菌絲生長之抑制情形

Table 1. Effect of the neutralized phosphorous acid (NPA)[z] and various chemicals on mycelial growth of *Phytophthora infestans* on rye B medium at 20℃ for 7 days

Chemical	Mycelial linear growth (mm/7 d) at chemical concentration of (mg/L, a.i.) 0	10	100	1000
NPA	28.5 ± 2.4 ab[y]	28.0 ± 2.3 ab	22.5 ± 3.4 bcd	0 ± 0 e
80% Fosetyl-aluminum WP		28.7 ± 4.2 a	23.0 ± 4.3 abcd	5.9 ± 4.8 e
35% Metalaxyl		25.1 ± 4.5 abc	18.3 ± 3.0 d	2.4 ± 3.0 e
35% Etridiazole WP		20.9 ± 6.9 cd	1.0 ± 2.0 e	0 ± 0 e
50% Dimethomorph		0 ± 0 e	0 ± 0 e	0 ± 0 e

[z] H_3PO_3 solution was neutralized with equal weights of KOH (both chemicals are of chemical grade).
[y] Mean ± sd. A total of 5 isolates were analysis. The same letters indicate not significantly different at 1% level by LSD test ($LSD_{0.01}$ = 5.32).

表 2. 中和後之亞磷酸 (NPA) 與不同化學殺菌劑對晚疫病菌胞囊發芽之影響

Table 2. Effect of the neutralized phosphorous acid (NPA)[z] and various chemicals on sporangial germination of *Phytophthora infestans* on rye B medium at 20℃ for 72 h

Chemical	Sporangial germination rate (%) at chemical concentration of (mg/L, a.i.) 0	10	100	1000
NPA	26.5 ± 5.4 c[y]	26.5 ± 1.9 c	8.0 ± 1.6 def	0 ± 0 g
80% Fosetyl-aluminum WP		35.9 ± 3.0 b	23.9 ± 4.6 c	13.4 ± 2.6 d
35% Metalaxyl		49.8 ± 3.0 a	40.6 ± 6.0 b	4.9 ± 2.3 efg
35% Etridiazole WP		56.3 ± 6.3 a	9.3 ± 7.7 de	0.8 ± 0.5 g
50% Dimethomorph		5.6 ± 1.3 efg	3.1 ± 0.6 efg	1.9 ± 1.3 fg

[z] H_3PO_3 solution was neutralized with equal weights of KOH (both chemicals are of chemical grade).
[y] Mean ± sd. A total of 5 isolates were analysed. The same letters indicate not significantly different at 1% level by LSD test ($LSD_{0.01}$ = 7.14).

亞磷酸防治田間馬鈴薯晚疫病之效果

NPA 防治田間馬鈴薯晚疫病之效果如表 3 與圖 1 所示。葉面噴布 1000 mg/L NPA、稀釋 200 倍之 80% 福賽得 (a.i. = 4000 mg/L) 及稀釋 4000 倍之 50% 達滅芬 (a.i. = 125 mg/L) 均可有效且顯著地 (1%) 降低田間晚疫病的罹病度。在噴施藥劑前，各處理的罹病度在 1% 顯著水準下均未達顯著差異。每星期施用 NPA 一次的處理，在施用 2 次與 4 次後的第 7 天，晚疫病的罹病度的平均值分別為 24.2%與 32.1%；而相同情況下，福賽得施用 2 次與 4 次後，罹病度分別為 27.5%與 35.0%；達滅芬為 24.2%與 28.3%；NPA、福賽得及達滅芬三處理間在 1%顯著水準下未達顯著差異。在相對應的時間下，對照處理罹病度分別為 34.6%與 92.1%，最後一次調查罹病度非常高，主要因在第 2 次與第 3 次噴藥期間，曾遇連續數日降雨，造成無施藥區罹病度急劇上升。試驗中，35%依得利可濕性粉劑在初期的防病效果尚可，但在病勢進展快速時，則無法有效抑制病害，第 4 次施藥後 7 天該處理之罹病度高達 57.1%，較 NPA、福賽得及達滅芬等處理顯著為差。

亞磷酸防治田間番茄晚疫病之效果

NPA 防治田間番茄晚疫病之效果如表 4 與圖 1 所示。在噴施藥劑前，各處理的罹病度差

表 3. 中和後之亞磷酸溶液 (NPA) 防治田間馬鈴薯晚疫病之效果

Table 3. Control of potato late blight with neutralized phosphorous acid solution (NPA) [z] in the field during winter-spring seasons of 1998–1999

Treatment (concentration, mg/L a.i.)	Disease severity (%) [y]		
	Pretreatment	7 d after the 2nd application	7 d after the 4th application
NPA (1000)	24.6 ± 4.7 a [x]	24.2 ± 6.2 a	32.1 ± 5.2 a
80% Fosetyl-aluminum WP (4000)	26.3 ± 2.2 a	27.5 ± 3.3 a	35.0 ± 5.6 a
35% Etridiazole WP (350)	27.1 ± 2.5 a	28.8 ± 3.7 a	57.1 ± 11.4b
50% Dimethomorph (125)	24.2 ± 2.0 a	24.2 ± 1.1 a	28.3 ± 11.2 a
Control	24.2 ± 2.9 a	34.6 ± 0.7 b	92.1 ± 13.7 c

[z] H_3PO_3 solution was neutralized with equal weights of KOH (both chemicals are of industrial grade).
[y] Disease severity = Σ [Disease index (ranking 0–4) × No. plants in the index]/(4 × No. of total tested plants) × 100%.
[x] Mean ± sd. The 24 potato (var. 'Kennebec') plants were used in each treatment with 3 replications. The same letters within each column indicate not significantly different at 1% level by LSD test.

表 4. 中和後之亞磷酸溶液 (NPA) 防治田間番茄晚疫病之效果

Table 4. Control of tomato late blight with neutralized phosphorous acid solution (NPA) [z] in the field during winter-spring seasons of 1998–1999

Treatment (concentration, mg/L a. i.)	Disease severity (%) [y]		
	Pretreatment	7 d after the 2nd application	7 d after the 4th application
NPA (1000)	23.8 ± 4.1 a [x]	26.7 ± 2.5 a	28.8 ± 5.4 a
80% Fosetyl-aluminum WP (4000)	22.1 ± 5.0 a	26.5 ± 1.3 a	31.3 ± 7.4 b
35% Etridiazole WP (350)	27.5 ± 2.0 a	38.4 ± 4.7 b	66.3 ± 5.6 c
50% Dimethomorph (125)	23.6 ± 3.1 a	25.3 ± 2.6 a	28.9 ± 6.9 a
Control	26.3 ± 2.6 a	42.2 ± 0.8 b	69.0 ± 5.9 c

[z] H_3PO_3 solution was neutralized with equal weights of KOH (both chemicals are of industrial grade).
[y] Disease severity = Σ [Disease index (ranking 0–4) × No. plants in the index]/(4 × No. of total tested plants) × 100%.
[x] Mean ± sd. The 20 tomato (var. 'Known-you 301') plants were used in each treatment with 3 replications. The same letters within each column indicate not significantly different at 1% level by LSD test.

圖 1. 使用中和後之亞磷酸溶液 (NPA，濃度 1000 mg/L) 三次後防治田間馬鈴薯晚疫病 (上) 與番茄晚疫病 (下) 之效果。

Fig. 1. Application of the neutralized phosphorous acid solution (NPA) at 1000 mg/L for 3 times with 7 d intervals for control of potato (upper) and tomato late blight (bottom) in the winter-spring field in 1998–1999. Phosphorous acid is neutralized with equal weights of potassium hydroxide in water.

異均未達 1%顯著水準。葉面噴布 1000 mg/L NPA、稀釋 200 倍之 80%福賽得及稀釋 4000 倍之 50%達滅芬均可有效的抑制田間晚疫病的罹病度上升，各處理的罹病度較對照處理顯著為低 (1%)，防治率達 36.8–67%。施用 NPA 的處理在噴施 2 次與 4 次後的第 7 天之晚疫病的罹病度的平均值分別為 26.7%與 28.8%；而相同情況下，施用福賽得之處理的罹病度分別為 26.5%與 31.3%；達滅芬為 25.3%與 28.9%；NPA、福賽得及達滅芬三處理間之差異未達 1%顯著水準。依得利處理在第 2 次噴藥與第 4 次施藥後 7 天的罹病度分別為 38.4%與 66.3%，較上述 3 處理顯著為差，而與對照無施藥處理 (罹病度分別為 42.2%與 69.0%) 之差異不顯著。

亞磷酸對田間晚疫病病勢進展之影響

自 2004 年 12 月至 2005 年 4 月 8 日於農試所番茄試驗田進行 NPA 防治晚疫病之試驗，番茄‘農友 301’與‘聖女’分 3 次相隔一個月種植，2004 年 12 月 2 日種植者於 43 日後 (2005 年 1 月 13 日) 開始出現晚疫病，於 1 月 15 日開始施用 1000 mg/L 之 NPA；2004 年 12 月 30 日種植者於 1 月 15 日即開始施用 NPA，於種植後 30 日 (2005 年 1 月 29 日) 開始發病；2005 年 2 月 1 日種植者於次日即開始施用 NPA，於種植後 20 日後 (2005 年 2 月 21 日) 出現病徵。施用 NPA 處理與對照處理的病勢進展情形如圖 2 所示，各處理之病勢進展趨勢有相似之處，但‘農友 301’品種之罹病度均較‘聖女’品種為高，顯示‘聖女’品種較為抗病 (或耐病)，但無論‘農友 301’或‘聖女’番茄在施用濃度 NPA 後，均可降低晚疫病的罹病度減緩病勢進展。

實驗發現晚疫病的發病嚴重度與降雨有關 (Hung *et al.* 2006)，該實驗期間之降雨日期為 2004 年 12 月 3–4 日、2005 年 1 月 13 日、2 月 18–22 日 (連續 5 日)、2 月 25 日–3 月 5 日 (連續 9 日)、3 月 11–14 日 (連續 4 日)、3 月 23 日、3 月 27 日–4 月 2 日 (連續 7 日)。當氣溫適合發病，但無連續降雨時，病勢進展較緩和時 (2005 年 2 月 18–25 日，連續降雨 7 日之前)，施用 NPA 之處理的平均罹病度約為對照處理的 40–60%以下 (防治率 40–60%以上)；但當連續降雨時 (2 月 18 日–3 月 14 日及 3 月 27 日–4 月 2 日)，晚疫病病勢進展極為快速，NPA 似乎無法有效壓抑晚疫病之發生，NPA 處理區的罹病度 (連續降雨 7 日之後) 為對照處理的 60–80% (防治率 20–40%)，似乎無法有效抑制病害。第一批種植的對照組 ‘農友 301’ 番茄在 2005 年 3 月 28 日完全死亡 (圖 2A)，施用 NPA 處理的罹病度亦高達 78.0%。第二批種植的番茄之病勢進展較第一批為快速，對照組‘農友 301’與‘聖女’分別在 2005 年 3 月 17 日與 3 月 28 日完全死亡 (圖 2B)，施用 NPA 處理的罹病度亦分別為 75.0%與 74.5%。第三批種植的番茄在初期之病勢進展非常快速，對照組‘農友 301’亦在 3 月 28 日完全死亡 (圖 2C)，施用 NPA 處理的罹病度為 78.5%；‘聖女’品種罹病度相對較輕，對照處理與施用 NPA 處理的罹病度分別為 68.5%與 42.5%，4 月 8 日後因氣溫升高，未有新病斑出現而結束實驗。

討　論

亞磷酸原為緩效性磷肥的一種 (MacIntire *et al.* 1950)，1980 年代一種防治卵菌類病害的系統性殺菌劑「福賽得」(Cohen & Coffey 1986) 研發成功，發現其代謝產物中的亞磷酸離子為主要的抑病物質，因此帶動亞磷酸防病效果之研究。目前亞磷酸，在國外，早已被開發與商品化成農藥與肥料 (Wicks *et al.* 1991; Chaluvaraju *et al.* 2004)，用來防治多種卵菌類引起的作物病害。在 1990 年代，商品化之亞磷

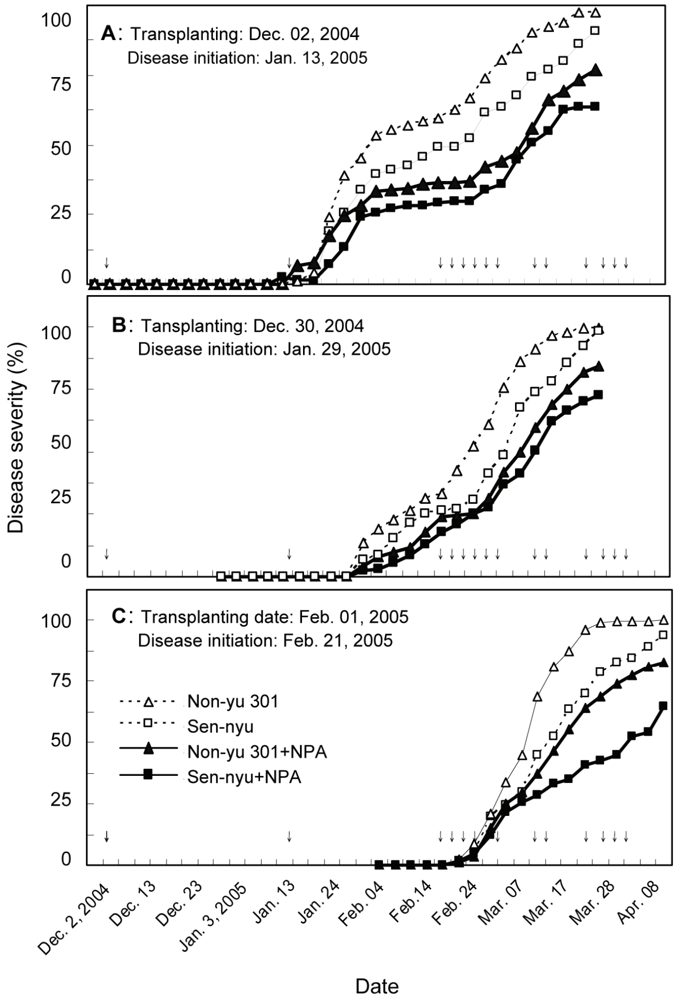


圖 2. 施用中和後之亞磷酸溶液 (NPA，濃度 1000 mg/L) 對番茄晚疫病病勢進展之影響。

Fig. 2. Effect of the neutralized phosphorous acid solution (NPA at 1000 mg/L) on disease development of tomato late blight in the winter-spring field in 2004–2005. Phosphorous acid is neutralized with equal weights of potassium hydroxide in water. ↓ indicates precipitation. {Disease severity = Σ [Disease index (ranking 0-4) × No. plants in the index]/(4 × No. of total tested plants) × 100%}.

酸產品亦曾進口至台灣，惟未能推廣成功。因此，本所同仁經多年研究，開發出一種亞磷酸的簡便配製方法 (Ann *et al.* 2000)，先篩選出最適合的中和劑氫氧化鉀，將需用之亞磷酸與氫氧化鉀以 1:1 (w/w) 等重秤量，接著將亞磷酸先溶於水後，再將氫氧化鉀加入溶解，中和後之亞磷酸溶液 (NPA) 之酸鹼值介於 pH 6.0–6.8，為弱酸性，此酸鹼值對植物不會造成藥害。

有關亞磷酸防治病害的作用與防病機制一直引起學者的興趣。目前學者們較認同亞磷酸兼具直接抑菌保護寄主 (direct protection) 與間接增強植物抵抗力 (indirect defense) 的雙重功效 (Smillie *et al.* 1989; Guest & Grant

1991)，但真正的分子抑病機制尚不了解。在高濃度下 (1000 mg/L 以上)，亞磷酸能夠直接殺死疫病菌與抑制其產胞，有直接保護寄主的功效，本實驗之結果亦顯示 NPA 在 1000 mg/L 的濃度下可以完全抑制晚疫病菌之菌絲生長與胞囊發芽 (表 1 & 2)。但在植物體內，亞磷酸離子的濃度一般很低，僅有百萬分之十左右 (數十個 ppm) (Fenn & Coffey 1984)，並無顯著殺菌效果。本實驗之結果亦顯示 NPA 在低濃度時 (10 mg/L) 完全沒有抑制晚疫病菌之菌絲生長與胞囊發芽的功效 (表 1 & 2)。因此，學者們認為亞磷酸應具有間接防禦功效，它能誘導植物增強抗病性。Saindrenan & Guest (1995) 之報告指出施用亞磷酸的處理，當病菌入侵時，寄主植物的抗禦素 (phytoalexin) 與其他抗病物質均會快速與大量累積，使植物能與入侵的病原菌對抗。本實驗測試之結果亦顯示，雖然在培養基上 NPA 在中、低濃度 (100 mg/L 與 10 mg/L) 下對晚疫病菌並無良好之抑菌效果，但它在田間卻有顯著的防病功效，顯示誘導抗病應為 NPA 防治晚疫病之機制之一。福賽得在國內外均廣泛推薦於作物疫病之防治，它施用於作物後 2–24 小時後會代謝成亞磷酸，為其主要抑菌機制之一 (Cohen & Coffey 1986)，因此福賽得與 NPA 在抑菌方面的表現很相似 (Afek & Sztejnberg 1989)，雖然在中、低濃度時於實驗室中均無良好之抑菌效果，但於田間試驗時可以顯著抑制病害的發生。

初期實驗之結果顯示，葉面噴布時，如果使用之 NPA 的濃度超過 1000 mg/L 時，可能會引起植物藥害，尤其是施用在果實與幼嫩組織時，因此本試驗使用之 NPA 濃度為 1000 mg/L。此外，早期的實驗顯示 NPA 每 7 天施用 1 次，連續施用 2–3 次的防病效果比單一次的效果顯著為佳 (Ann *et al.* 2000)，因此本試驗選擇連續使用 3 次。在 2004 冬季至 2005 春季的田間實驗結果顯示，在 12 月至翌春 2 月中旬，無連續降雨時，連續施用 3 次 1000 mg/L 之 NPA 可以明顯抑制晚疫病菌感染番茄，罹病度比對照處理明顯為低，下降 40–60%以上，病勢進展的速率亦十分緩慢；但當遇到連續降雨時 (2005 年 2 月 18 至 3 月 14 日的 25 日當中有 18 日降雨)，NPA 在 1000 mg/L 的濃度下似乎無法有效壓抑病勢進展曲線的攀升，罹病度僅比對照組低 20–40%。這可能與降雨環境下晚疫病菌大量產胞，造成感染源濃度太高，以致 NPA 誘導之植物抗病能力不足以有效對抗病菌的侵染，才造成病情嚴重。如果田間單獨使用 NPA 而未將對照無施藥處理參雜在內，處理區面臨之病原濃度的壓力可能會較低，較能凸顯 NPA 的防病效果，這需要進一步大面積的測試。

在其他實驗中發現 NPA 對許多作物的疫病與荔枝露疫病有相當好的防治效果 (報告準備中)，包括金柑與枇杷幼苗疫病；木瓜、柳橙、金柑之果實疫病；辣椒與甜椒疫病；蘭花 (虎頭蘭、文心蘭、報歲蘭)、非洲菊及百合疫病，防治率均在 60–100%。由於亞磷酸為肥料而非化學合成農藥，可以在採果期間使用，以保障農民與消費者健康；使用 NPA 後可以減少農藥使用，符合發展安全農業的宗旨；而且亞磷酸的價格十分便宜，對降低生產成本增加農民收益幫助良多。

誌　謝

本試驗部份經費承蒙行政院國家科學委員會補助 (NSC 88-2313-B-055-004, NSC 89-2313-B-055-002, NSC 90-2313-B-055-002NSC)，謹此誌謝。

引用文獻 (Literature cited)

Afek, U. and A. Sztejnberg. 1989. Effects of fosetyl-Al and phosphorous acid on scoparone, a phytoalexin associated with resistance of citrus to *Phytophthora citrophthora*. Phytopathology 79:736–739.

Ann, P. J. and T. T. Chang. 2000. Why late blight of potato and tomato dramatically breaking out in Taiwan at

the end of 1977. *in* the Proceedings of Symposium on Pest Epidemics and Control Strategies in Taiwan. Taichung, Taiwan. (in Chinese with English abstract)

Ann, P. J., T. T. Chang, and L. L. Chern. 1998. Mating type distribution and pathogenicity of *Phytophthora infestans* in Taiwan. Bot. Bull. Acad. Sin. 39:33–37.

Ann, P. J., T. J. Chang, and J. N. Tsai. 1998. Comparison of characteristics of strains of *Phytophthora infestans* isolated before and after 1988 in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 7:209 (abstract in Chinese)

Ann, P. J., T. F. Hsieh, J. N. Tsai, I. T. Wang, and C. Y. Lin. 2000. A simple method for use of phosphorous acid and the spectra of disease control. Plant Pathol. Bull. 9:179. (abstract in Chinese)

Caten, C. E. and J. L. Jinks. 1968. Spontaneous variability of single isolates of *Phytophthora infestans*. Can. J. Bot. 46:6–47.

Chaluvaraju, G, P. Basavaraju, N. P. Shetty, S. A. Deepak, K. N. Amruthesh, and H. S. Shetty. 2004. Effect of some phosphorous-based compounds on control of pearl millet downy mildew disease. Crop Prot. 23:595–600.

Cohen, T. and M. D. Coffey. 1986. Systemic fungicides and the control of oomycetes. Annu. Rev. Phytopathol. 24:311–338.

Fenn, M. E. and M. D. Coffey. 1984. Studies on the in vitro and in vivo antifungal activity of fosetyl-Al and phosphorous acid. Phytopathology 74:606–611.

Guest, D. I. and B. R. Grant. 1991. The complex action of Phosphonates in plants. Biol. Rev. 66:159–187.

Hung, L. Y., K. S. Chiang, P. J. Ann, J. N. Tsai, and T. C. Wang. 2006. Establishment of the predicted models for tomato late blight in epidemiology. Plant Pathol. Bull. 14:310. (abstract in Chinese)

Fei, W. C. and M. Y. Wang. 2007. Plant Protection Manual. Agric. Chem. Pest. Inst. Pub. Taichung, Taiwan, ROC. 884 pp. (in Chinese with English abstract)

Johnson, D. A., D. A. Inglis, and J. S. Miller. 2004. Control of potato tuber rots caused by oomycetes with foliar applications of phosphorous acid. Plant Dis. 88:1153–1159.

Jyan, M. H., P. J. Ann, J. N. Tsai, S. D. Hsih, T. T. Chang, and R. F. Liou. 2004. Recent occurrence of *Phytophthora infestans* US-11 as the cause of severe late blight on potato and tomato in Taiwan. Can. J. Plant. Pathol. 26:188–192.

Kawakami, T. and R. Suzuki. 1908. List of fungi on cultivated plants of Formosa, Part I. Bull. Agric. Exp. Sta. Gov. Formosa. 1:1–64.

MacIntire, W. H., S. H. Winterberg, L. J. Hardin, A. J. Sterges, and L. B. Clements. 1950. Fertilizer evaluation of certain phosphorus, phosphorous, and phosphoric materials by means of pot cultures. Agron. J. 42:543–549.

Mckay, A. G. and R. M. Floyd. 1992. Phosphonic acid control downy mildew (*Peronospora parasitica*) in cauliflower curds. Aust. J. Exp. Agric. 32: 127–129.

Pegg, K. G., A. W. Whiley, J. B. Saranah, and R. J. Glass. 1985. Control of *Phytophthora* root rot of avocado with phosphorous acid. Aust. Plant Pathol. 14: 25–29.

Saindrenan, P. and D. V. Guest. 1995. Involvement of phytoalexins in the response of phosphonate-treated plants to infection by *Phytophthora* species. p.375–390. *in*: Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action. (Daniel, M. and R. P. Purkayastha, eds.) Marcel Dekker, INC. New York.

Sawada, K. 1919. Descriptive Catalogue of the Formosa Fungi I. Bull. Agric. Exp. Sta. Gov. Formosa. 19:1–695.

Semal, J. 1995. The epic of potato blight (1845–1995). Cah. (Cahiers) Agric. 4:287–298.

Smillie, R., B. R. Grant, and D. Guest. 1989. The mode of action of phosphate: evidence for both direct and indirect modes of action on three *Phytophthora* spp. in plants. Phytopathology 79: 921–926.

Wicks, T. J., P. A. Magarey, M. F. Waxhtel, and A. B. Frensham. 1991. Effect of postinfection application of phosphorous (phosphonic) acid on the incidence and sporulation of *Plasmopara viticola* on grapevine. Plant Dis. 75:40–43.

Control of Phytophthora Late Blight of Potato and Tomato with Neutralized Phosphorous Acid [1]

Jyh-Nong Tsai [2], Pao-Jen Ann[2,3], Ien-Tien Wang[2], Shin-Yuan Wang[2], and Chyung-Yue Hu[2]

Abstract

Tsai, J. N., P. J. Ann, I. T. Wang, S. Y. Wang, and C. Y. Hu. 2009. Control of Phytophthora late blight of potato and tomato with neutralized phosphorous acid. J. Taiwan Agric. Res. 58:185–195.

The effect of the neutralized phosphorous acid solution (NPA) prepared with a simple method on suppression of *Phytophthora infestans* and control of potato and tomato late blight was evaluated. The proposed method involved dissolving phosphorous acid in water before adding equal weights of potassium hydroxide. NPA at a concentration of 1000 mg/L (a.i.) completely inhibited the mycelial growth and sporangial germination of *P. infestans* on rye B agar plates, while the inhibitory effects of NPA at lower concentration (100 or 10 mg/L) decreased dramatically. The inhibition rates of mycelial growth and sporangial germination of *P. infestans* at 100 mg/L NPA were decreased to 21% and 69.9%, respectively, and at 10 mg/L NPA down to 0%. When NPA at 1000 mg/L was foliar-sprayed to the plants of potato var. 'Kennebec' and tomato var. 'Known-you 301' for 2–4 times at 7 d intervals in the naturally infected fields in 1999–2000, the disease severity of Phytophthora late blight of both crops were significantly and effectively suppressed. The disease reduction by 2 applications and 4 applications were 30.1% and 65.2%, respectively, for potato late blight, and 36.8% and 58.3%, respectively, for tomato late blight in comparison with the control. Application of NPA at 1000 mg/L for 3 times every 6 weeks was also effective in suppression of tomato late blight, and thereby delay disease progress in the fields during the winter-spring seasons of 2004–2005. The disease severity of both tomato varieties 'Known-you 301' and 'Sen-nyu' were 40–60% less than those without spray in the dry periods, whereas NPA treatments were only 20–40% less than controls during continuous rain.

Key words: Disease control, Phosphorous acid, Phytophthora late blight, Potato, Tomato.

---

1. Contribution No.2365 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: August 10, 2009.
2. Respectively, Associate Plant Pathologist, Director and Plant Pathologist, Assistant, Assistant, and Assistant, Plant Pathology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Corresponding author, e-mail: pjann@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 58(3):196–207 (2009)

感染洋桔梗之番椒葉脈斑駁病毒之分離與鑑定 [1]

鄭櫻慧[2,4] 陳金枝[2] 廖吉彥[2] 鄧汀欽[2] 張清安[3]

摘　要

鄭櫻慧、陳金枝、廖吉彥、鄧汀欽、張清安。2009。感染洋桔梗之番椒葉脈斑駁病毒之分離與鑑定。台灣農業研究 58:196–207。

本研究於 2004 年自嘉義縣新港鄉採集到植株略微矮化，葉片呈現黃化圓斑，疑似病毒感染之洋桔梗植株。將其接種於奎藜 (*Chenopodium quinoa*) 葉片，10 日後所出現的局部病斑經過 3 次單斑分離後將其接種於 *Nicotiana benthamiana* 保存，經回接洋桔梗後在其接種葉出現不明顯黃化圓斑，接種甜椒則出現輕微葉脈斑駁病徵。純化病毒蛋白質經 SDS-PAGE 分析，鞘蛋白分子量估計約為 31 kDa，此純化病毒並用來免疫白兔製備抗血清，作為 ELISA 檢測之用。LIS1 病毒分離株與辣椒葉脈斑駁病毒 (*Chilli veinal mottle virus*, ChiVMV) 具有血清類緣相關性，但利用 potyvirus 的簡併式引子進行反轉錄聚合酵素連鎖反應以增幅其 3’端基因體並進行選殖及定序分析，與登錄於 GenBank 之 potyviruses 比對結果發現，所分離之病毒與番椒葉脈斑駁病毒 (*Pepper veinal mottle virus,* PVMV, EU719467) 的鞘蛋白基因具有 99.3%的相同度。綜合以上證據顯示本研究由洋桔梗所分離之 potyvirus 應為 PVMV 之一分離株，這是 PVMV 可以感染洋桔梗之首次紀錄。

關鍵詞：洋桔梗、番椒葉脈斑駁病毒。

前　言

洋桔梗 [*Eustoma russellianum* (Don.) Griseb] 原產於美國中南部內布拉斯加州 (Nebraska) 至德克薩斯州 (Texas) 一帶，屬於龍膽科 (Gentianaceae) 之宿根草本花卉。台灣自 1968 年由日本引入栽種後，近年來已快速發展為新興之切花作物，種植主要分佈於彰化、雲林及嘉義等縣。由於洋桔梗花型和花色豐富多樣，耐貯運，其切花到消費地吸水後可快速恢復活力，平均價格每把 10 支約為百元左右，因此栽培面積和產量急速增加。近年來種植面積雖略下降，但至 2007 年種植面積仍有 59 ha，產量在 1600 萬枝以上，每年銷日的洋桔梗約 200 萬枝以上。洋桔梗是一種需要極佳技術才能栽培成功的花卉，目前國內栽培上最大的問題是苗株會因不良環境造成簇生化 (Rosette) 現象，栽培者多以購買進口苗或涼溫

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2366 號。接受日期：98 年 8 月 19 日。
2. 本所植物病理組副研究員、助理研究員、助理研究員、研究員。台灣 台中縣 霧峰鄉。
3. 朝陽科技大學生化研究所教授。台灣 台中縣 霧峰鄉。
4. 通訊作者，電子郵件: yhcheng@tari.gov.tw；傳真：(04)23302803。

養成苗解決。除此之外，其病害發生種類繁多，其中有關危害洋桔梗之病毒種類至少有 15 種，包括 *Ageratum yellow vein virus* (AYVV, *Begomovirus*) (Cheng *et al.* 2005)、*Bean yellow mosaic virus* (BYMV, *Potyvirus*) (Chang & Lin 1990; Gera & Cohen 1990; Lisa & Dellavalle 1987)、*Broad bean wilt virus* (BBWV, *Fabavirus*) (Chen *et al.* 2000, 2002; Iwaki *et al.* 1987)、*Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*) (Chen & Hu 1999; Gera & Cohen 1990; Provvidenti 1985)、*Lisianthus necrotic virus* (LNV, *Necrovirus*) (Chen & Hsu 2002; Chen *et al.* 2001; Iwaki *et al.* 1987)、*Lisianthus line pattern virus* (LLPV, *Ilarvirus*) (Lisa *et al.* 1994)、*Tobacco mosaic virus* (TMV, *Tobamovirus*) (Gera & Cohen 1990)、*Tomato mosaic virus* (ToMV, *Tobamovirus*) (Jan *et al.* 2003)、*Tomato spotted wilt virus* (TSWV, *Tospovirus*) (Chu *et al.* 2001; Lisa *et al.* 1990; Wolcan *et al.* 1996)、*Turnip mosaic virus* (TuMV, *Potyvirus*) (Chao *et al.* 2000)、*Iris yellow spot virus* (IYSV, *Tospovirus*) (Kritzman *et al.* 2000)、*Impatiens necrotic spot virus* (INSV, *Tospovirus*) (Mc Govern *et al.* 1997)、*Sweet potato sunken vein virus* (SPSVV, *Closterovirus*) (Cohen *et al.* 2001)、*Tobacco streak virus* (TSV, *Ilarvirus*) (de Freitas *et al.* 1996)、*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, *Begomovirus*) (Cohen *et al.* 1995) 等。台灣紀錄已發生之病毒種類包含 BYMV (Chang & Lin 1990)、LNV (Chen & Hsu 2002; Chen *et al.* 2001)、BBWV (Chen *et al.* 2000)、CMV (Chen & Hu 1999)、TSWV (Chu *et al.* 2001)、TuMV (Chao *et al.* 2000)、ToMV (Jan *et al.* 2003) 及 AYVV (Cheng *et al.* 2005) 等病毒。

2004 年自嘉義縣新港鄉採集到植株略微矮化，葉片呈現黃化圓斑洋桔梗病株，利用 ELISA 偵測時，與 BYMV、BBWV、CMV、TuMV 之抗血清皆無反應。因此對其進行病毒分離、純化及選殖定序分析之研究，最終證實其為番椒葉脈斑駁病毒 (*Pepper veinal mottle virus,* PVMV)，這是 PVMV 感染洋桔梗的首次紀錄。

材料與方法

病毒分離與寄主範圍測定

採集自新港的洋桔梗植株呈現疑似病毒感染之病徵，包括植株略微矮化及葉片出現黃化圓斑等，取其葉片以 10 倍量 (W/V) 磷酸緩衝液 (0.01 M $KHPO_4$, pH 7.0) 研磨後，接種於灑有 400 目金剛砂之奎藜 (*Chenopodium quinoa* Willd.) 葉片。接種葉片出現黃斑後，切取單斑磨汁再接種於奎藜，如此重複 3 次單斑分離後，接種於 *Nicotiana benthamiana*，作為本試驗接種源，並以病葉組織置於 50% 甘油中於 -20℃長期保存。

取罹病 *N. benthamiana* 作為接種源，依前述方法接種於藜科 (Chenopodiaceae)、龍膽科 (Gentianaceae) 和茄科 (Solanaceae) 等 3 科 9 種植物 (表 1)，置於溫室中連續觀察病徵發展 6 週，並摘取葉片進行 ELISA 檢測，確認病毒是否感染。

病毒之純化

病毒接種於 *N. benthamiana* 經過 18–20 天，採集出現病徵的葉片作為純化材料。純化方法依 Gonsalves & Ishii (1980) 之方法但略加修改進行。每克病葉加入 2 mL PE 萃取緩衝液 (0.5 M $KHPO_4$, pH 7.5, 0.25% Na_2SO_3, 10 mM EDTA) 以果汁機打碎，過濾後加入氯仿及四氯化碳 (各 0.5 mL/g) 淨化，經低速離心 (12,000 *g*, 10 分鐘) 去除綠色殘渣。上層液加入 8% PEG6000，於 4℃下攪拌後，經低速離心 (12,000 *g*, 10 分鐘) 取其沉澱物，以 0.1 M PE (pH 7.0) 緩衝液懸浮，再經低速離心去除綠色殘渣。上澄液加入 8% PEG 及 0.3 M NaCl，攪

拌後經低速離心，沉澱物以 0.1 M PE 緩衝液懸浮，同樣經過低速離心去除殘渣後加入 15% (W/V) 硫酸銫 (Cs_2SO_4)，溶解後取此溶液加至下層墊有 53%硫酸銫之 PE 緩衝液中，111,000 *g* 離心 16 小時。吸取綿密狀病毒層，以 0.1 M PE 緩衝液透析後以光譜儀 (Hitachi UV-2000 spectrophometer) 於波長 320 nm 至 200 nm 自動掃描，並依 260 nm 波長的吸收光度計算病毒濃度。

抗血清之製備

以純化病毒為抗原，肌肉注射於紐西蘭白兔，每週注射 1 次，連續注射 4 週。病毒懸浮液 (1 mg/mL) 與等量之完全佐劑 (Freund's complete adjuvant) 混合乳化後進行第一次注射，之後 3 次則以不完全佐劑 (Freund's incomplete adjuvant) 進行乳化。第 5 週開始進行耳朵靜脈採血。採得血液於 37℃ 中靜置 1 小時，低速離心使分層後吸取上層之血清，保存於-20℃ 中備用。

表 1. 番椒葉脈斑駁病毒洋桔梗分離株在供試植物上之反應

Table 1. Host reactions of *Pepper veinal mottle virus* lisianthus isolate (Lis1) on tested plants

	Reactions	
Tested plant	Inoculated leaves	Systemic leaves
Chenopodiaceae		
Chenopodium amaranticola	LL[z]	-
C. quinoa	LL	-
Gentianaceae		
Eustoma russellianum	CS	CS
Solanaceae		
Capsicum annuum	-	Mo
C. frutescens	-	Mo
Lycopersicum esculentum	-	Mo
Nicotiana benthamiana	-	M, CR
N. tabacum	-	-
Petunia × *hybrida*	-	Mo

[z] Abbreviation of symptoms: chlorotic spot (CS), crinkle (CR), local lesion (LL), mosaic (M), mottle (Mo), no symptom (-).

間接酵素連結免疫分析 (Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

本試驗參照以往之研究報告進行 (Clark & Adams 1977)，取 0.1 g 之罹病葉組織，以 3 mL 之 15 mM 碳酸鈉緩衝液 (sodium carbonate buffer, pH 9.6) 研磨均勻後，加入 ELISA 反應盤內，每樣品 2 個重複，置於 37℃ 生長箱 4 小時進行覆膜反應 (coating reaction)；然後以 1× PBST (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 緩衝液沖洗 3 次；其次加入病毒抗體後，放置在 37℃ 定溫箱反應 2 小時；再以 1× PBST 緩衝液沖洗 3 次後，加入已溶於磷酸緩衝液 (137 mM NaC1, 1.5 mM KH_2PO_4, 1 mM Na_2HPO_4, 0.05% Tween 20, pH 7.4) 之山羊抗兔二級抗體 (Goat anti-Rabbit immunoglobin, Jackson, West Grove, PA, 100 µL/孔)，置於 37℃ 之定溫箱反應 2 小時；最後再以 1 × PBST 緩衝液沖洗 4 次後，再以 150 µL/孔之比例加入濃度為 1 mg/mL 之鹼性磷酸酶酵素基質 (ρ-NPP, Amresco, Solon Ind., Ohio, USA) 進行呈色反應。反應 20 至 30 分鐘，以 ELISA 讀值儀 (PTI max micro plate reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 讀取波長 405 nm 下之吸收值，作為評估病毒濃度高低之依據。樣品讀值大於健康葉片之 2 倍者，視為正反應。

西方漬染法 (Western blotting)

取 0.1 g 之罹病葉組織，以液態氮磨碎後，加入 200 µL 之樣品處理液 (75 mM Tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 1 mM EDTA, 30% glycerol, 6% SDS, 9% β-Mercaptoethanol, 0.015% Bromophenol blue)，研磨液加熱處理後經 SDS-PAGE 電泳後，膠體上之蛋白轉漬於 PVDF 膜 (Millipore Co., MA, USA)，之後以病毒抗血清進行漬染反應。供試材料包括：本試驗分離純化的洋桔梗病毒分離株、本實驗室分

離自甜椒之 PVMV Pep1 分離株、ChiVMV、PVY，分離自蕃茄之 PVMV Tom1 分離株、及健康對照。

RNA 之抽取及反轉錄-聚合酶連鎖反應

取 100 mg 的病葉，利用總量 RNA 純化試劑組 (Total RNA extraction kit, Qiagen, Hilden, Germany) 進行 RNA 之萃取。以純化所得之 RNA 進行反轉錄-聚合酶連鎖反應 (reverse transcription-ploymerase chain reaction, RT-PCR)，RT-PCR 以單一步驟 RT-PCR 試劑組 (Genemark Co., Taichung, Taiwan) 進行，25 μL 的反應液中加入 1 μL 的 RNA、各 2.5 μL 之 20 μM 簡併式引子 Hrp5/Pot1 (Chen *et al.* 2006)。RT-PCR 之進行於熱循環反應儀 (GeneAmp model 2400, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT) 中，設定反應程序為 50℃下進行反轉錄 30 分鐘，94℃變性 1.5 分鐘；之後進行 30 個 PCR 循環反應：94℃下變性 1 分鐘，50℃下鍊合 1.5 分鐘，72℃下聚合 2 分鐘，最後一個循環之 72℃聚合反應延長為 6 分鐘。反應產物以 1.2%電泳瓊膠 (SeaKem, Agarose, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, ME USA) 進行分析。

鞘蛋白基因之選殖及分析

上述 RT-PCR 增幅所得之 1.3 kb DNA 片段以 TOPO TA-PCRⅡ Cloning Kit (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) 進行選殖。篩選得到之選殖株抽取質體經限制酶 EcoRI 酶切確認插入 DNA 大小後，用於進行定序分析。定序反應委託明欣生物科技公司進行。定序所得之核苷酸序列以 Vector NTI Suite (InforMax Inc., Wisconsin, USA) 分析軟體進行分析，並與 NCBI (National Center for Biotechnology Information, http://www.bcbi.nlm.nih.gov/) 之 GenBank 資料庫內已登錄之核苷酸與胺基酸序列進行分析比對。

結　果

寄主植物之病徵反應

於 2004 年自嘉義縣新港鄉採得葉片具有系統性黃斑的洋桔梗葉片 (圖 1A)，經過 indirect ELISA 測試，並非受 BYMV、LNV、BBWV、CMV、TSWV、ToMV 及 TuMV 感染。利用葉片汁液機械接種於奎藜 (*C. quinoa*)，10–12 天後出現局部病斑，經 3 次單斑分離後，回接於奎藜及系統性寄主 *N. benthamiana*，此病毒分離株稱為 Lis1。以下之試驗以 *N. benthamiana* 作為試驗接種源，長期保存材料則以病葉組織浸泡於甘油：磷酸緩衝液 (1：1) 保存於-20℃。

機械接種 3 科 9 種植物 (表 1)，Lis1 回接洋桔梗 (*E. russellianum*) 時產生產生系統性黃斑，病徵與田間病徵相同 (圖 1B)。接種藜科作物之紅藜 (*C. amaranticola*) 也和奎藜一樣，只在接種葉產生單斑 (圖 1C)。接種茄科作物 *N. benthamiana* 14 天後，在心葉出現嵌紋及葉片捲曲變細等系統性病徵。接種辣椒 (*Capsicum annuum*)、甜椒 (*C. frutescens*) 和番茄 (*Lycopersicum esculentum*) 都只出現不明顯的系統性斑駁病徵 (圖 1D, E)，經由 ELISA 測試皆為正反應。

病毒純化與鞘蛋白分子量測定

接種 Lis1 病毒分離株的 *N. benthamiana* 葉片經純化後所得病毒，其 A260/A280 比值為 1.20，估算病毒回收量為 4.2 mg/100 g 葉片。

以 SDS 解離純化病毒顆粒，經 12% SDS-PAGE 分析，在蛋白標誌 27–42 kDa 之間有一條帶 (圖 2)，估計其分子量約為 31 kDa。

抗體之製備與血清類緣分析

抗血清製備：純化病毒經免疫注射白兔後，共採得約 100 mL 抗血清。抗血清稀釋 100–10,000 倍進行 ELISA 時，與接種 Lis1 病

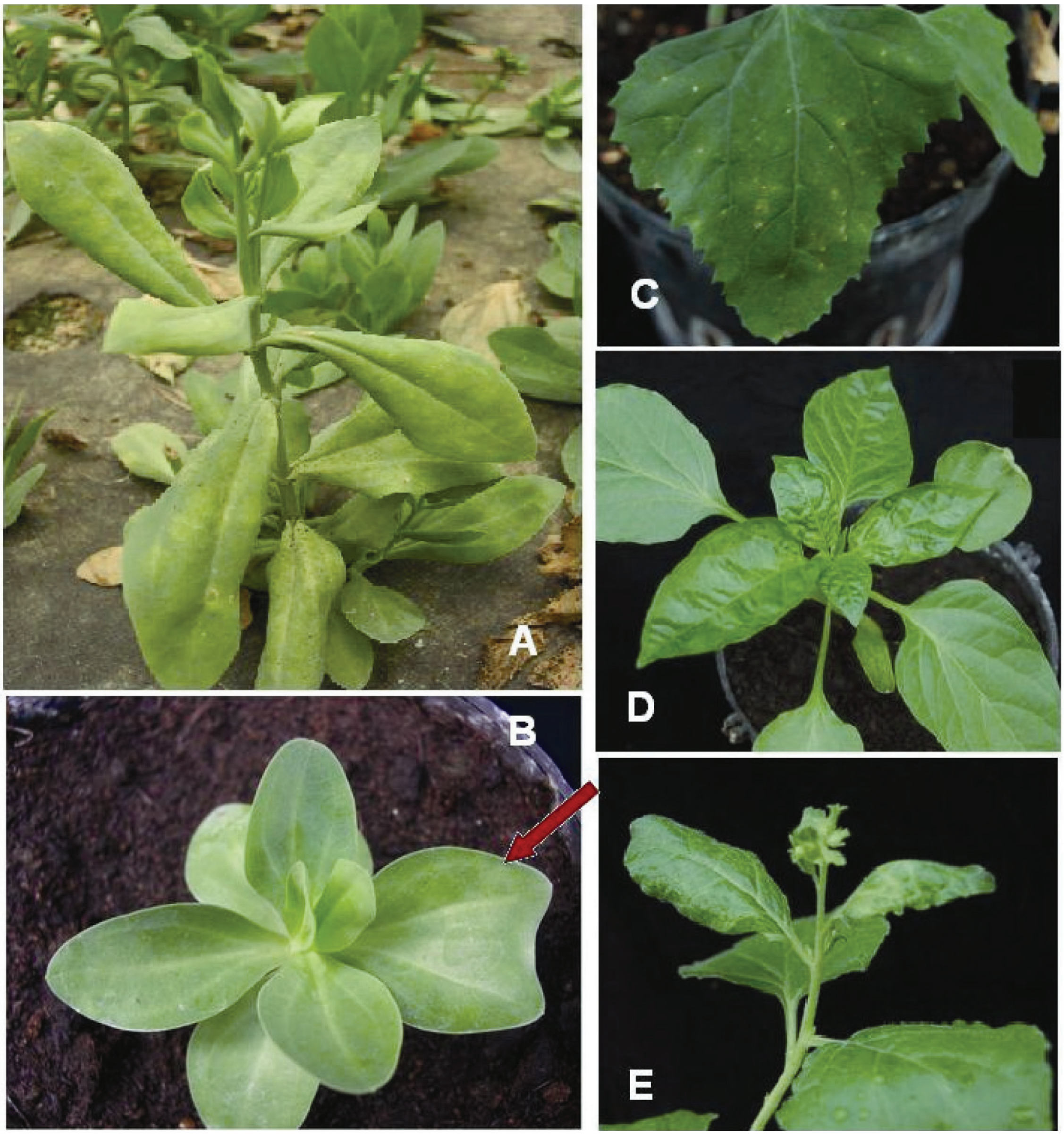


圖 1. 洋桔梗病毒分離株 Lis1 引起的病徵：(A) 田間罹病洋桔梗葉片黃化圓斑之病徵；(B) 分離病毒回接後洋桔梗之模糊黃化圓斑；(C) 紅藜接種葉產生之侷限型黃化圓斑；(D) 機械接種甜椒葉片之嵌紋與皺縮病徵；(E) 接種 *Nicotiana benthamiana* 之葉片嵌紋、下捲變形病徵。

Fig. 1. Symptoms caused by infection of lisianthus virus isolate 'Lis1'. (A) A field infected lisianthus plant showed chlorotic spots on leaves where 'Lis1' was isolated; (B) Faint chlorotic lesions developed on lisianthus seedling; (C) Local lesions showed on inoculated leaf of *Chenopodium armarenticola*; (D) 'Lis1' inoculated to *Capsicum annuum* resulted in leaf mosaic and deformatiom; (E) Systemic mosaic and leaf curling appeared on *Nicotiana benthamiana*.

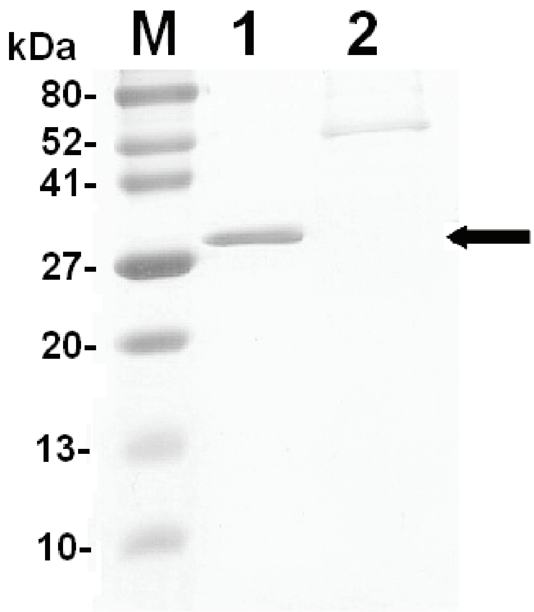


圖 2. 利用膠體電泳分析洋桔梗病毒 Lis1 之鞘蛋白。Lane 1：純化病毒；Lane 2：未接種病毒對照；M：蛋白分子量標誌。

Fig. 2. Analysis of coat protein of ‘Lis1’ with sodium dodecyle sulfate-polyacryamide gel electrophoreses (SDS-PAGE). Lane 1: purified virion (2 μg) of Lis1; Lane 2: mock-inoculated *N. benthamiana* control; Lane M: protein markers.

毒分離株的 *N. benthamiana* 呈正反應，以下實驗選擇稀釋 2000 倍進行。

間接酵素聯結免疫分析：以本實驗室製備之 ChiVMV、PVY、TuMV 及前述 Lis1 等病毒分離株製備的抗血清為抗體，與接種 Lis1 病毒的 *N. benthamiana* 葉片粗汁液 [30 倍稀釋液 (W/V) 研磨於 coating buffer] 進行間接酵素聯結免疫分析。Lis1 抗血清稀釋 10–10,000 倍時反應最好，讀值在 1.84–2.23 之間。Lis1 另與 ChiVMV 抗血清有正反應，抗血清稀釋 10–10,000 倍時讀值在 1.71–2.42 之間。Lis1 與 ChiVMV 抗血清稀釋至 100,000 倍時，A405 nm 讀值下降至 0.44 與 0.53，但仍能判別為正反應 (圖 3)。Lis1 與 PVY 及 TuMV 抗血清在本試驗無正反應。

西方漬染法：利用 Lis1 分離株製備的抗血清進行西方漬染分析，洋桔梗病毒 Lis1、PVMV Tom1 及 Pep1、ChiVMV 與 PVY 接種之煙草粗汁液都有正反應條帶，未接種病毒的植物粗汁液則無此條帶 (圖 4)。Lis1 反應條帶分子量大小與 SDS-PAGE 分析純化病毒之鞘蛋白分子量大小相似，西方漬染法中與 PVMV Tom1 及 Pep1 之條帶高度相同。Lis1 抗血清與 PVY 反應很弱，ChiVMV 條帶位置較 PVMV 高。

鞘蛋白基因之選殖與核苷酸序列分析

利用偵測 *Potyvirus* 之簡併式引子 Hrp5 和 Pot1，以接種 Lis1 的 *N. benthamiana* 葉片總量 RNA 和純化病毒的 RNA 進行 RT-PCR，反應結果以 1.2% agarose 膠體電泳分析，增幅之 DNA 片段為 0.7、1.0 和 1.4 kb 3 條帶，未接種

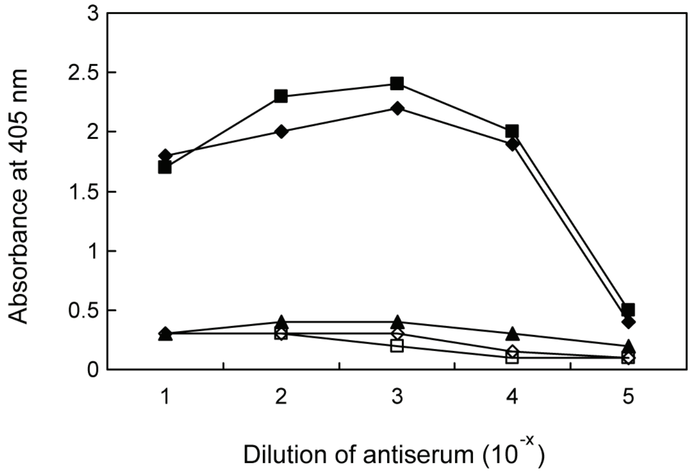


圖 3. 以間接酵素聯結免疫分析法分析洋桔梗病毒分離株 Lis1 與其他 3 種病毒間之血清類緣關係。感染 Lis1 的煙草 (*N. benthamiana*) 作為抗原，以 Lis1 (◆)、ChiVMV (■)、PVY (▲)、TuMV (◇) 之抗血清及未免疫白兔血清 (□) 系列稀釋進行 ELISA 分析。

Fig. 3. Serological relationships among the lisianthus isolate 'Lis1' and three potyviruses analyzed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. Extract of 'Lis1' infected *N. benthamiana* was used as antigen. Antisera against Lis1 (◆), ChiVMV (■), PVY (▲), TuMV (◇), and normal rabbit serum (□) were serially diluted in this assay.

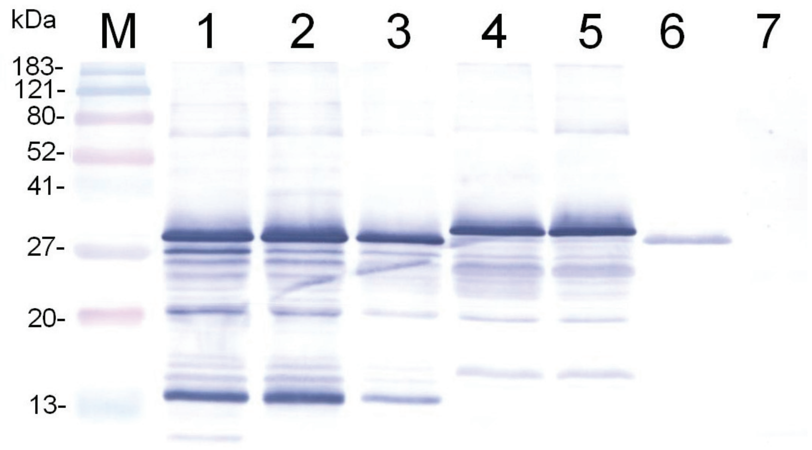


圖 4. 利用西方漬染法分析洋桔梗病毒分離株 Lis1 與其他病毒之血清類緣關係。病毒接種 *N. benthamiana* 之粗汁液做為分析樣品，分別為 Lane 1：Lis1；Lane 2：PVMV Pep1；Lane 3：PVMV Tom1；Lane 4 & 5：ChiVMV；Lane 6：PVY；Lane7：未接種病毒之對照；M：蛋白分子量標誌。

Fig. 4. Western blotting analysis of lisianthus isolate 'Lis1'. Crude sap of inoculated *N. benthamiana* was used as antigen. Lane 1: 'Lis1'; Lane 2: PVMV Pep1; Lane 3: PVMV Tom1; Lane 4 & 5: ChiVMV; Lane 6: PVY; Lane 7: mock-inoculated control.

病毒之 *N. benthamiana* 葉片總量 RNA 進行之 RT-PCR 對照組則只有 0.7 和 1.0 kb 2 條帶，1.4 kb DNA 為 Lis1 感染 *N. benthamiana* 的特有條帶 (圖 5)。

增幅之 1.4 kb DNA 片段經 TOPO TA 選殖套組選殖後，所得之選殖株經定序後，共有 1438 個核苷酸，包含病毒之部分 NIb 基因 (252 nt)、鞘蛋白基因 (810 nt) 和 3'非轉譯區 (376 nt)。經 BLAST 程式比對 NCBI 之 GenBank 資料庫內登錄之序列，搜尋結果在 E 期望值均為 0 之情形下，PVMV Lis1 分離株鞘蛋白基因與 PVMV-Tom1 (EU719647) 有 99.3% 的相同度，胺基酸序列有 99.3%的相同度，與 PVMV-Pep1 (EU719646) 有 99.1% 的相同度，胺基酸序列有 99.3%的相同度，與 PVMV-BS (FJ617225) 有 98.8% 的相同度，胺基酸序列有 98.1%的相同度，此三病毒株皆為台灣發現之病毒；與韓國登錄之感染茄科作物分離株鞘蛋白基因亦有 99.3%相同度 (胺基酸具有 98.9% 相似度)，高於非洲及近東地區發現之分離株 (表 2)。

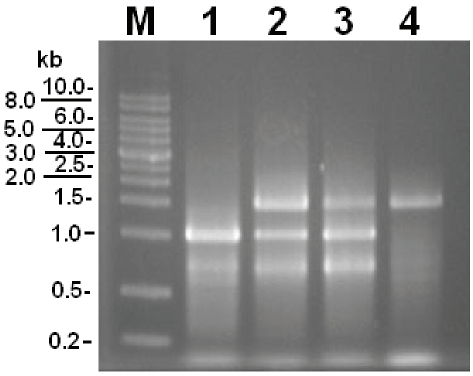


圖 5. 利用簡併式引子對 PRP5/Pot1 進行 RT-PCT，增幅 Lis1 分離株基因體 3'端基因。Total RNA 分別純化自 Lis1 接種之 *N. benthamiana* (Lane 2 & 3) 與 PVMV Pep1 接種之 *C. annuum* (Lane 4)，分別得到分子量約 1.4 kb 之 RT-PCT 專一性產物。未接種之 *N. benthamiana* 之 total RNA 做為負對照 (Lane 1)，增幅約 1.0 kb 及 0.7 kb DNA 之非專一性產物；Lane M 為分子量標誌。

Fig 5. Electrophoresis analyses of RT-PCR amplified products of the 3' portion of isolate 'Lis1' viral genome. A product of 1.4 kb was amplified from total RNA prepared from 'Lis1' (Lane 2 & 3) infected *N. benthamiana* and PVMV Pep1 infected *C. annuum* (Lane 4) by RT-PCR with degenerate primers PRP5/Pot1. Total RNA of mock-inoculated *N. benthamiana* (Lane 1) was used as negative control. Lane M: molecular size markers.

表 2. 洋桔梗病毒分離株 Lis1 與 NCBI 之 GenBank 資料庫已發表之 PVMV 鞘蛋白基因序列比較

Table 2. Comparisons of the nucleotide and amino acid sequences of the coat protein gene of lisianthus isolate 'Lis1' (Acc. No. FJ843065) with those of documented PVMV isolates in GenBank of NCBI

Accession No.	Country	Nucleotide identity (%)	Amino acid identity (%)
EU719647	Taiwan	99.3	99.3
EU719646	Taiwan	99.1	99.3
DQ645484	Korea	99.3	98.9
FJ617225	Taiwan	98.8	98.1
AJ780968	Ghana	92.8	97.4
AJ780966	Senegal	91.7	97.4
AJ780967	Cameroon	91.3	97.0
AJ780970	Ethiopia	84.3	91.4
AJ780969	Yemen	81.2	90.0
DQ854943 (ChiVMV)	Taiwan	76.4	78.0

比較 PVMV Lis1 分離株與 ChiVMV 鞘蛋白基因之核苷酸與胺基酸序列分別為 76.4%相同度與 78.0%相似度 (表 2)，但若進一步比較其胺基酸排列，二者在 N 端 DAG 序列之後有一段序列不同，這段區域 ChiVMV 有 42 個胺基酸，PVMV 只有 25 個胺基酸。其後約佔鞘蛋白 80%區域的 237 個胺基酸相似度高達 92.8% (圖 6)。

討　論

本研究經由病毒的生物特性、血清學、鞘蛋白分子量及其基因序列分析，證明 2004 年自嘉義縣新港鄉所採集的洋桔梗病害標本之病毒分離株 Lis1 是馬鈴薯 Y 病毒屬 (*Potyvirus*) 之一種 PVMV。PVMV 盛行於非洲、突尼西亞和近東地區，晚近才在遠東地區之韓國 (GenBank 資料) 和台灣 (Cheng *et al.* 2009) 發現。相較於辣椒葉脈斑駁病毒 (ChiVMV)，後者在台灣地區普遍危害茄科作物且與 PVMV 有血清關連性 (Moury *et al.* 2005; Tsai *et al.* 2008)。但 ChiVMV 寄主範圍限於藜科和茄科，PVMV 則寄主範圍較為廣泛，共可感染 13 科 46 種植物。洋桔梗屬於龍膽科，以往並無被 PVMV 感染的紀錄，本研究首次證實 PVMV 可以感染洋桔梗並影響其外觀及生長。

```
                    1                                                50
ChiVMV        (1)   GESVDAGSVKGEDSSSKSADKQATEKKNKVSGQAQPQSRQSEMEVPQVRD
PVMV-Lis      (1)   GETVDAG---------KSSGKEVTASK-------QP-TTSQPTEAKTVLD
Consensus     (1)   GESVDAG         KSA K  T  K       QP S     E   V D
                    51                                              100
ChiVMV       (51)   RDVNVGTSGTFTIPRLKGIFSKLTIPKVKTKAVVNLEHLLDYAPDQIHLS
PVMV-Lis     (34)   RDVNAGTQGTFTIPRLKGMSSRLTLPKVSSQSVVNLEHLLNYKPDQVHLS
Consensus    (51)   RDVN GT GTFTIPRLKGI SKLTIPKV S AVVNLEHLL Y PDQIHLS
                    101                                             150
ChiVMV      (101)   NTRALQSQFASWYEGVKNDYDVTDEQMQIILNGLMVWCIENGTSPNINGY
PVMV-Lis     (84)   NTRALQSQFASWYNGVKNDYDVDDEQMKIILNGLMVWCIENGTSPNINGM
Consensus   (101)   NTRALQSQFASWY GVKNDYDV DEQM IILNGLMVWCIENGTSPNING
                    151                                             200
ChiVMV      (151)   WVMMDGDEQVEYPIKPLIDHAKPSFRQIMAHFSNLAEAYIEKRNSEKPYM
PVMV-Lis    (134)   WVMVDGEEQIEYPIKPLIDHANPSFRQIMAHFSNLAEAYIEKRNSEKSYM
Consensus   (151)   WVMMDGDEQIEYPIKPLIDHA PSFRQIMAHFSNLAEAYIEKRNSEK YM
                    201                                             250
ChiVMV      (201)   PRYGLQRNLTDMSLARYAFDLYEMTSKTPVRAREAHIQMKAAALRGVSNR
PVMV-Lis    (184)   PRYGLQRNLTDMSLARYAFDFYEMTSKTPVRAREAHIQMKAAALRNANNR
Consensus   (201)   PRYGLQRNLTDMSLARYAFD YEMTSKTPVRAREAHIQMKAAALR   NR
                    251                               286
ChiVMV      (251)   MFGLDGRVGTQEEDTERHTAEDVNRNMHNLLGVRGL
PVMV-Lis    (234)   MFGLDGKVGTQEEDTERHTAEDVNRNMHNLLGVRGV
Consensus   (251)   MFGLDGKVGTQEEDTERHTAEDVNRNMHNLLGVRGL
```

圖 6. PVMV Lis1 與 ChiVMV 鞘蛋白胺基酸序列比對。

Fig. 6. Comparison of deduced amino acid sequences of PVMV ‘Lis1’ coat protein with ChiVMV.

利用西方漬染法分析結果，ChiVMV 條帶位置較 PVMV 高 (圖 4)，此結果符合定序分析鞘蛋白基因及其回推胺基酸序列之結果，ChiVMV 之鞘蛋白含 286 胺基酸，推測其分子量為 32.3 kDa，PVMV 之鞘蛋白含 270 胺基酸，推測其分子量為 30.3 kDa。且二者鞘蛋白除了在 N 端 DAG 序列之後有一段序列不同之外，其他約 80%的胺基酸序列似度高達 92.8% (圖 6)，因此利用本試驗製備的多元抗體無法區分二者 (圖 3、4)，此結果與 Moury *et al*. (2005) 的結果一致。PVMV Lis1 分離株與 ChiVMV 雖然具有血清類緣關係，但因鞘蛋白基因之核苷酸與胺基酸序列相同度均低於 80%，仍為二不同病毒 (Tsai *et al*. 2008)。圖 3 之 ELISA 反應中，抗血清稀釋 100–100,000 倍時，Lis1 病毒分離株與 ChiVMV 抗血清之反應值均略高於 Lis1 抗血清，雖然實驗中都選用第 5 次採血所得到之抗血清，可能 ChiVMV 抗血清之力價高於 Lis1 抗血清，使其反應值均略高。

PVMV 在台灣已有感染甜椒、辣椒、蕃茄 (Cheng *et al*. 2009) 和龍葵 (Liao *et al*. 2009) 的紀錄，在接種試驗中，Lis1 分離株之寄主範圍及病原性都與甜椒分離株相同，田間不排除由茄科作物傳播至洋桔梗植株，花農應多注意田區周圍雜草管理及器具傳播，減少病毒傳播。

引用文獻 (Literature cited)

Chang, C. A. and H. H. Lin. 1990. Isolation of *Bean yellow mosaic virus* from lisianthus developing foliar mosaic and flower breaking symptoms. Plant Pathol. Bull. 2:250–251.

Chao, C. H., C. C. Chen, C. A. Chang, and C. C. Chen. 2000. Identification of a *Turnip mosaic virus* isolate causing systemic yellow spotting on lisianthus. Plant Pathol. Bull. 9:115–122.

Chen, C. C., Y. K. Chen, and H. T. Hsu. 2000. Characterization of a virus infecting lisianthus. Plant Dis. 84:506–509.

Chen, C. C. and H. T. Hsu. 2002. Occurrence of a severe strain of *Lisianthus necrosis virus* in imported carnation seedlings in Taiwan. Plant Dis. 86:444.

Chen, C. C., H. T. Hsu, F. L. Chiang, and C. A. Chang. 2006. Serological and molecular properties of five potyviruses infecting calla lily. Acta Hortic. 722: 259–269.

Chen, C. C. and C. C. Hu. 1999. Purification and characterization of a cucumovirus from *Liaianthus rusellianus*. Plant Prot. Bull. 41:179–198.

Chen, C. C., C. C. Hu, Y. K. Chen, and H. T. Hsu. 2002. A fabavirus inducing ringspot disease in lisianthus. Acta. Hortic. 568:51–57.

Chen, C. C., S. L. Tsao, and H. T. Hsu. 2001. Diagnosis of *Lisianthus necrosis virus* infection by light and electron microscopy and serological assay. Plant Pathol. Bull. 10:105–114.

Cheng, Y. H., C. C. Chen, and C. A. Chang. 2005. Whitefly-transmitted geminiviruses in ornamental plants and their control strategies in Taiwan. p.95–105. *in* the Proceedings of the international seminar on whitefly management and their control strategy. Food and Fertilizer Tech. Cent. and Agric. Res. Inst. Pub. Taichung, Taiwan, ROC.

Cheng, Y. H., R. Y. Wang, C. C. Chen, C. A. Chang, and F. J. Jan. 2009. First report of *Pepper veinal mottle virus* in tomato and pepper in Taiwan. Plant Dis. 93:107.

Chu, F. H., C. H. Chao, M. H. Chung, C. C. Chen, and S. D. Yeh. 2001. Completion of the genome sequence of *Watermelon silver mottle virus* and utilization of degenerate primers for detecting tospoviruses in five serogroups. Phytopathology 91:361–368.

Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34:475–483.

Cohen, J., A. Gera, R. Ecker, J. R. Ben, M. Perlsman, M. Gokkes, O. Lachman, and Y. Antignus. 1995. Lisianthus leaf curl a new disease of lisianthus caused by *Tomato yellow leaf curl virus*. Plant Dis. 79:416–420.

Cohen, J., M. Lapidot, G. Loebenstein, and A. Gera. 2001. First report of *Sweet potato sunken vein virus* occurring in lisianthus. Plant Dis. 85:697.

de Freitas, J. C., E. W. Kitajima, and J. A. M. Rezende. 1996. First report of *Tobacco streak virus* on lisianthus in Brazil. Plant Dis. 80:1080.

Gera, A. G. and J. Cohen. 1990. The natural occurrence of *Bean yellow mosaic*, *Cucumber mosaic* and *Tobacco mosaic viruses* in lisianthus in Israel. Plant Pathol. 39:561–564.

Gonsalves, D. and M. Ishii. 1980. Purification and serology of papaya ringspot virus. Phytopathology 70:1027–1032.

Iwaki, M., K. Hanaka, E. R. A. Maria, and S. Onogi. 1987. *Lisianthus necrosis virus*, a new necrovirus from *Eustoma russellianum*. Phytopathology 77:867–870.

Jan, F. J., Y. X. Zheng, C. H. Chao, W. F. Ko, C. C. Chang, and C. C. Chen. 2003. Identification of a tobamovirus causing yellow mottle and stunting symptoms on lisianthus in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 12:122–132.

Kritzman, A., H. Beckelman, S. Alexandrov, J. Cohen, M. Lampel, M. Zeidan, B. Raccah, and A. Gera. 2000. Lisianthus leaf necrosis: A new disease of lisianthus caused by *Iris yellow spot virus*. Plant Dis. 84:1185–1189.

Liao, J. Y., T. C. Deng, and Y. H. Cheng. 2009. Pepper veinal mottle virus isolated from black nightshade. Plant Prot. Bull. (in press)

Lisa, V. and G. Dellavalle. 1987. Bean yellow mosaic virus in *Lisianthus russellianus*. Plant Pathol. 36:214–215.

Lisa, V., A. M. Varia, M. d'Aquilio, G. Dellavalle, G. Masenga, R. G. Milne, and G. Bocardo. 1994. Characterization of an Ilarvirus from lisianthus (*Eustoma grandiflorum*). Acta Hortic. 377:81–89.

Lisa, V., A. M. Varia, R. G. Milne, E. Luisoni, and S. Rapetti. 1990. *Tomato spotted wilt virus* in five crops on Liguria. Inform. Fitopathol. 40:34–41.

McGovern, R. J., J. E. Polston, and B. K. Harbaugh. 1997. Detection of a severe isolate of *Impatiens necrotic spot virus* infecting lisianthus in Folrida. Plant Dis. 81:1334.

Moury, B., A. Palloix, C. Caranta, and P. Gognalons. 2005. Serological, molecular, and pathotype diversity of *Pepper veinal mottle virus* and *Chili veinal mottle virus*. Phytopathology 95: 227–232.

Provvidenti, R. 1985. Two newly recognized hosts of *Cucumber mosaic virus*: *Eustoma grandiflorum* and *Peristrophe angustiofolia*. Plant Dis. 69:524.

Tsai ,W. S., Y. C. Huang, D. Y. Zhang, K. Reddy, S. H. Hidayat, W. Srithongchai, S. K. Green, and F. J. Jan. 2008. Molecular characterization of the CP gene and 3'UTR of *Chilli veinal mottle virus* from South and Southeast Asia. Plant Pathol. 57: 408–416.

Wolcan, S., L. Ronco, E. D. Bo, G. Lori, and H. Alippi. 1996. First report of diseases on lisianthus in Argentina. Plant Dis. 80:223.

Isolation and Identification of *Pepper Veinal Mottle Virus* on Lisianthus[1]

Ying-Huey Cheng[2,4], Chin-Chih Chen[2], Jye-Yann Liao[2], Ting-Chin Deng[2], and Chin-An Chang[3]

Abstract

Cheng, Y. H., C. C. Chen, J. Y. Liao, T. C. Deng, and C. A. Chang. 2009. Isolation and identification of *Pepper veinal mottle virus* on lisianthus. J. Taiwan Agric. Res. 58:196–207.

Lisianthus plants exhibited stunting and yellow spots were collected from Chiayi county in 2004. Virus isolates were obtained through 3 successive single lesion passages on *Chenopodium quinoa* and then propagated on *Nicotiana benthamiana.* The virus isolate caused mild mottle symptoms on bell pepper plants and faint yellow spots on lisianthus leaves. Virus particles were purified from infected *N. benthamiana* by polyethylene glycol precipitation and then followed by Cs_2SO_4 isopycnic centrifugation. Relative molecular weight of the coat protein of the virus was 31 kDa when analysis by SDS-PAGE. Antiserum has been produced by immunizing rabbit with virus particles. Indirect ELISA and Western blotting analyses indicated that the lisianthus virus was serologically related to *Chilli veinal mottle virus* but not to *Potato virus Y* and *Turnip mosaic virus*. Using the potyvirus degenerate primers, a 1.4 kb DNA fragment was amplified by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Sequence data of the amplified fragment revealed that the causal virus was an isolate of *Pepper veinal mottle virus* as it shared 99.3% identities to the nucleotide sequence of coat protein (CP) gene of PVMV (EU719467). This is the first report of PVMV infection on lisianthus.

Key words: Lisianthus, *Pepper veinal mottle virus*.

---

1. Contribution No.2366 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: August 10, 2009.
2. Respectively, Associate Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, Researcher, Plant Pathology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Professor, Graduate Institute of Biochemical Science and Technology, Chaoyang University of Technology, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Corresponding auther, e-mail: yhcheng@tari.gov.tw; Fax: (04)23302803.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 58(3):208–218 (2009)

荔枝新品種台農 3 號玫瑰紅之育成 [1]

張哲瑋[2,4] 顏昌瑞[3] 徐信次[2] 王婉伶[2] 蔡武雄[2] 程永雄[2] 何昭吉[2]

摘　要

張哲瑋、顏昌瑞、徐信次、王婉伶、蔡武雄、程永雄、何昭吉。2009。荔枝新品種台農 3 號玫瑰紅之育成。台灣農業研究 58:208–218。

荔枝「台農 3 號」(75-S-1-4) 是農業試驗所嘉義分所歷經 20 年選育而成，於民國 95 年 12 月通過農委會果樹品種審議委員會審議，並於民國 96 年 3 月取得品種權。本品種果實品質優良，單果重在 23 g 至 29 g，種子重在 1.0 g 至 3.2 g，果肉率在 67%至 75%，可溶性固形物含量在 17.4°Brix 至 20.2°Brix，可滴定酸在 0.12% 至 0.17%之間，果肉 Q 並帶有如玫瑰般的特殊香氣，果皮顏色如紅玫瑰般的鮮紅美豔，果棘圓鈍，果皮縫合線明顯，縫合線兩邊的果皮會略微突起，果皮易從縫合線剝開，且剝開後果肉易從果蒂脫落，因此食用時，果肉及果汁不沾手，為其一大特點。

關鍵詞：荔枝、台農 3 號、玫瑰紅、育種。

前　言

荔枝為台灣重要的常綠果樹，栽培面積近 12,000 ha。台灣栽培品種以「黑葉」為主，佔全部栽培面積 79% (Hsu 2008)，產期集中，由南部到中部不到 2 個月，造成產銷失衡，滯銷情形時有所聞，尤其是中部地區常是果賤傷農。在學理上解決產期集中的方法有 3 種，分別是以栽培方法調節產期 (Teng 2006)，以貯藏方式延長果品櫥架壽命 (Huang *et al.* 1991) 及選育出不同產期的品種 (Chang *et al.* 2008)。但前兩種方法，目前在荔枝上，尚缺乏簡易有效低成本的方式。因此，選育產期相異、質優及豐產的品種仍是最有效的辦法。

目前在台灣與「黑葉」產期相異的主要商業栽培品種，有「玉荷包」、「糯米糍」、「桂味」等。「玉荷包」屬早熟種，品質優，但產量不穩定，不易栽培且成本高。「糯米糍」與「桂味」屬晚熟種，其中「糯米糍」品質優，但產量低，且不易栽培，而「桂味」產量雖高，然品質略差 (Yen *et al.* 1984)。農業試驗所嘉義分所有鑑於此，乃於民國 75 年起以自然授粉法實生選種的方法進行育種。此法是先在嘉義分所果園成立一荔枝基因庫，在此基因庫內慎選各具特色的 15 種栽培品種，並精心設計種植，待這些植

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2367 號。接受日期：98 年 9 月 8 日。

2. 本所嘉義分所副研究員、研究員兼園藝系主任、聘用助理研究員、研究員兼分所長、前研究員兼分所長、前技工。台灣省 嘉義市。
3. 屏東科技大學教授兼農學院院長。台灣省 屏東縣。
4. 通訊作者，電子郵件：jerway@dns.caes.gov.tw；傳真機：(05)2773630。

株開花結果後取得種子育苗後，再經定植進行實生選種。經過 20 年的努力，選拔出代號為「75-S-1-4」之優良品系，於民國 95 年 12 月 20 日獲得農委會果樹品種審議委員會審核通過，命名為荔枝「台農 3 號玫瑰紅」，96 年 3 月底，正式取得品種權。由於本品種之果皮顏色如紅玫瑰般的艷麗，且果肉具有玫瑰的特殊香味，故取名為「玫瑰紅」。

材料與方法

本品種之母本可能為種植於上述嘉義分所荔枝基因庫的「桂味」或「糯米糍」，於民國 75 年取得種子後培育實生苗定植在分所之試驗果園，依一般栽培管理陸續進行選拔及各項試驗調查。

實生苗培育與選拔

民國 77 年將實生苗以行株距 2.5 m × 0.25 m 密植於嘉義農業試驗分所果園。共定植 1376 株。生育期間依一般荔枝栽培管理及病蟲害防治。民國 83 年起陸續開花結果，民國 83 年至 85 年共評估 116 個實生品系，選出品質較優良者 11 品系，包括「台農 3 號玫瑰紅」(品系代號為 75-S-1-4)。

品系種比較試驗

民國 86 年將表現優異之 75-S-1-4「台農 3 號玫瑰紅」與對照品種「黑葉」進行比較試驗，供試植株為高壓苗，每品種系各為 5 株，行株距為 4 m × 3 m。民國 86 年 11 月種植，並按一般栽培方法肥培管理及病蟲害防治。試驗期間並取相鄰之嘉義分所荔枝品種園之「糯米糍」及「桂味」之高壓株，各 5 株當作參考對照品種，行株距為 4 m × 3 m，株齡為 10 年。試驗調查項目為果實性狀及單株產量。各調查方法如下：

果實性狀：民國 90、91 及 92 年度在預估果實採收期間，每株隔週取樣一次共 3 次，每次每株於東南西北各取 1 串果實調查，果實調查項目包括果實之單果重、果皮重、果肉重、種子重、焦核率、可溶性固形物含量及酸度。焦核種子 (chicken-tongue seed) 是胚發育過程中敗育所產生，種子外表有皺縮的現象。可溶性固形物含量係取每個果實搾汁，以屈折計測定。酸度係每 5 個果實搾汁混合，取原液 5 mL 加去離子水定量至 100 mL 以 0.1 N 的 NaOH 標準液滴定至 pH 8.3 之體積換算為琥珀酸 (succinic acid) 之百分比 (%)。以所有採收果實平均可溶性固形物最高的那一次採收當作適當採收期，及統計分析的依據。

單株產量：第 2 次果實取樣時，預留第 3 次要取樣的果實，其餘果實全部採收稱重，3 次取樣的果實重量加上採收的重量為單株產量。

區域試驗

75-S-1-4「台農 3 號玫瑰紅」之區域試驗選在雲林縣古坑鄉及高雄縣杉林鄉兩處篤實農戶之荔枝園。在雲林試區對照品種為「黑葉」、「糯米糍」。種植日期為民國 87 年，試驗材料皆為高壓苗，種植行株距為 4 m × 4 m。各品系種逢機取 5 株，調查果實性狀及單株產量。調查方式與品系種比較試驗相同。唯民國 93 年起因試作農戶無法配合單株產量的調查，因此僅進行果實性狀的調查。

在高雄試區對照品種為「玉荷包」。75-S-1-4「台農 3 號玫瑰紅」為嫁接株，嫁接時期為 91 年 3 月，砧木為 5 年生楠西早生高壓苗，「玉荷包」則為 5 年生高壓苗。供試品種系皆為 5 株，調查果實性狀，果實性狀調查方式與品系種比較試驗相同。唯民國 94 年秋季因遭逢颱風侵襲，75-S-1-4「台農 3 號玫瑰紅」高接苗全數折斷，因此僅有民國 94 年的調查資料。

植物性狀檢定

檢定品種為「台農 3 號玫瑰紅」(75-S-1-4)，對照品種為「黑葉」，參考對照品種為「糯米糍」及「桂味」，植物性狀檢定項目參照台灣地區現

有作物栽培品種名錄 (Chao 1999)，檢定期間為民國 92 年至 97 年，檢定地點為農業試驗所嘉義分所試區及雲林試區。

結 果

實生苗初選

民國 83 年初選 30 個品系，民國 84 年初選 6 品系，民國 85 年初選 82 品系，3 年共初選得品質優良者 11 品系，其中 75-S-1-4「台農 3 號玫瑰紅」於民國 83 年及 85 年表皆佳 (因民國 83 年強剪採收所導致 84 年不開花，不能視為其正常表現)，單果重約 25 g，種子重自 1.4 g 至 2.3 g，果肉率在 72.8%至 73.3%之間，可溶性固形物自 16.8°Brix 至 19.8°Brix 之間 (表 1)。

品系種比較試驗

在嘉義分所民國 90 年期至 92 年期連續 3 年之試驗結果如表 2，75-S-1-4 平均單果重介於 25 g 至 29 g 之間，顯著高於「黑葉」、「糯米糍」、「桂味」，後三者僅 18 g 至 22 g；75-S-1-4 之果肉重為 17 g 至 21 g 亦顯著較「黑葉」、「糯米糍」、「桂味」之 14 g 至 16 g 為高，果皮重亦以 75-S-1-4 最高；種子重則是在民國 90 年及 91 年以 75-S-1-4 最高，但在民國 92 年則除「糯米糍」較低外，其餘 3 品種彼此間無差異。果肉率之比較在 3 年之試驗結果並不一致，民國 90 年以「黑葉」較高，民國 91 年以「黑葉」及「桂味」較高，民國 92 年則 4 品種間無差異；焦核率則僅「糯米糍」在民國 92 年有 25%，其他品種於試驗期間無焦核現象；可溶性固形物則在 75-S-1-4 及「糯米糍」為 17°Brix 至 20°Brix，「黑葉」為 16°Brix 至 18°Brix，「桂味」為 15°Brix 至 17°Brix。4 個品種的酸度皆介於 0.1%至 0.2%之間；果皮顏色「黑葉」為暗紅，「糯米糍」為淡紅，其餘 2 品種為鮮紅。單株產量整體而言是以「桂味」最高，然「桂味」是 14 至 16 年生，植株亦較株齡 4 至 6 年生的 75-S-1-4 及「黑葉」為大，倒是株齡同為 14 至 16 年生的「糯米糍」連續 3 年的產量極不穩定，不同年份之

表 1. 民國 83 年至 85 年荔枝優良實生品系果實品質性狀與採收日期比較
Table 1. Fruit characteristics and harvest dates of litchi seedling [z]

Year	Selection/Variety	FW [y] (g)	PW (g)	AW (g)	SeW (g)	AP (%)	TSS (°Brix)	PC	HD (m/d)
1994	72-11-96	26.3 ± 0.8	5.8 ± 0.2	17.4 ± 0.5	3.1 ± 0.1	66.2 ± 0.6	18.4 ± 0.1	Bright red	6/24
	75-15-13	22.3 ± 0.2	3.4 ± 0.1	16.0 ± 0.2	2.9 ± 0.2	71.7 ± 0.2	16.9 ± 0.2	Bright red	6/11
	75-19-5	21.3 ± 0.7	3.6 ± 0.2	15.2 ± 0.6	2.5 ± 0.3	71.4 ± 1.2	18.6 ± 0.2	Dark red	6/11
	75-3-2	20.1 ± 0.4	3.1 ± 0.1	14.4 ± 0.2	2.6 ± 0.1	71.6 ± 0.1	16.5 ± 0.1	Dark red	6/11
	75-S-1-4	24.7 ± 0.7	4.3 ± 0.2	18.1 ± 0.5	2.3 ± 0.2	73.3 ± 1.2	16.8 ± 0.2	Bright red	6/24
	76-C-2	29.5 ± 0.4	4.1 ± 0.1	24.3 ± 0.3	1.1 ± 0.1	82.4 ± 0.4	17.6 ± 0.2	Green with mild red	6/11
1996	72-11-96	27.4 ± 0.3	6.8 ± 0.1	16.7 ± 0.2	3.9 ± 0.1	60.9 ± 0.4	18.7 ± 0.2	Dark red	7/01
	75-19-5	17.8 ± 0.2	3.8 ± 0.1	12.1 ± 0.2	1.9 ± 0.1	67.9 ± 0.3	19.6 ± 0.3	Dark red	7/01
	75-20-2	25.3 ± 0.4	5.4 ± 0.1	17.9 ± 0.4	2.0 ± 0.1	70.8 ± 0.5	18.0 ± 0.2	Green with mild red	7.01
	75-S-1-4	25.0 ± 0.6	5.4 ± 0.2	18.2 ± 0.5	1.4 ± 0.1	72.8 ± 0.6	19.8 ± 0.3	Bright red	7/01
	76-C-2	27.7 ± 0.4	4.1 ± 0.1	22.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1	80.5 ± 0.3	18.1 ± 0.1	Green with mild red	6/12
	76-10-5	24.9 ± 0.3	3.6 ± 0.0	17.4 ± 0.2	3.9 ± 0.1	69.9 ± 0.4	19.3 ± 0.2	Dark red	7/01
	77-3-2-17	18.5 ± 0.3	3.0 ± 0.1	14.7 ± 0.2	0.8 ± 0.0	79.5 ± 0.3	17.1 ± 0.1	Bright red	6/05
	71-3-55-18	24.5 ± 0.3	4.5 ± 0.1	17.9 ± 0.2	2.1 ± 0.1	73.1 ± 0.6	15.3 ± 0.2	Bright red	5/22

[z] The material for trails were 8 years old seedling in 1994; data were mean ± standard error of 20 fruits.
[y] Abbreviation, FW: Fruit weight; PW: Peel weight; AW: Aril weight; SeW: Seed weight; AP: Aril percentage; TSS: Total soluble solids; PC: Peel color; HD: Harvesting date; m/d: month/day.

表 2. 品系種比較試區荔枝品種果實性狀、單株產量及採收期比較

Table 2. Comparisons of fruit characteristics, yield and harvest dates among litchi Tainung No.3 Rose red (75-S-1-4), Hak Yip, No Mi Tsz and Kwai Mi at Chia Yi Agricultural Experiment station [z]

Year	Selection/Variety	FW [y] (g)	PW (g)	AW (g)	SeW (g)	AP (%)	CS (%)	TSS (°Brix)	TA (%)	PC	Yield (k/p)	HD (m/d)
2001	75-S-1-4	29.3 a [x]	5.2 a	20.9 a	3.2 a	71.3 b	3 a	17.3 a	0.14 b	Bright red	16.7 b	7/11
	Hak Yip	21.2 b	3.1 b	16.0 b	2.2 b	75.1 a	2 a	16.1 b	0.19 a	Dark red	18.5 b	6/14
	No Mi Tsz	20.7 b	3.8 b	15.0 b	2.0 b	72.2 b	10 a	18.4 a	0.13 b	Light red	12.0 c	7/02
	Kwai Mi	21.6 b	4.0 b	15.6 b	2.0 b	72.2 b	0 a	17.0 a	0.13 b	Bright red	30.0 a	6/28
2002	75-S-1-4	25.1 a	5.1 a	16.8 a	3.2 a	67.0 c	0 a	18.3 a	0.16 a	Bright red	21.8 b	6/21
	Hak Yip	18.1 b	2.4 b	13.7 c	2.0 b	75.8 a	0 a	17.7 b	0.14 b	Dark red	24.8 b	6/07
	No Mi Tsz	19.3 b	3.5 b	13.5 c	2.3 b	69.8 b	0 a	19.3 a	0.14 b	Light red	36.0 a	6/23
	Kwai Mi	20.8 b	3.1 b	15.3 b	2.4 b	73.5 a	0 a	15.2 c	0.18 a	Bright red	40.0 a	6/27
2003	75-S-1-4	25.2 a	4.7 a	18.1 a	2.4 a	71.9 a	5 b	20.1 a	0.12 b	Bright red	36.8 a	6/23
	Hak Yip	21.7 b	3.8 b	15.3 b	2.5 a	70.9 a	0 b	18.4 b	0.13 b	Dark red	36.8 a	6/16
	No Mi Tsz	18.2 c	3.3 b	13.7 c	1.9 b	69.8 a	25 a	28.0 a	0.13 b	Light red	20.0 b	6/16
	Kwai Mi	21.7 b	3.4 b	16.0 b	2.3 a	73.7 a	0 b	16.7 c	0.16 a	Bright red	34.0 a	6/24

[z] The material for trails were air layer plants. In 2001, Tainung No.3 (75-S-1-4) and Hak Yip were 4 years old, No Mi Tsz and Kwai Mi were 14 years old.

[y] Abbreviation, FW: Fruit weight; PW: Peel weight; AW: Aril weight; SeW: Seed weight; AP: Aril percentage; CS: Chicken tongue seed percentage; TSS: Total soluble solids; TA: Titratable acidity; PC: Peel color; HD: Harvesting date; k/p: kg/plant; m/d: month/day.

[x] Means followed by the same letters at the same column within the same year were not significantly different at 5% level by LSD test.

產量可相差 3 倍，且有 2 年之產量顯著較 75-S-1-4 及「黑葉」低，至於同株齡的 75-S-1-4 與「黑葉」之產量，兩者比較無差異。至於採收期，75-S-1-4、「糯米糍」及「桂味」較相近，為 6 月下旬至 7 月上中旬，「黑葉」較早為 6 月上至中旬，75-S-1-4 採收期較「黑葉」晚 7 至 27 天。

區域試驗

雲林試區試驗：民國 91 年至 94 年連續 4 年之試驗結果如表 3。75-S-1-4 平均果重約為 23 g 至 27 g，顯著高於「黑葉」，後者僅為 16 g 至 21 g，值得注意的是民國 91 年為乾旱年而雲林試區並無灌溉設備，而嚴重影響「黑葉」之果重，其果重較其餘正常年 (民國 92 至 94 年) 減輕 20%；反之 75-S-1-4 之果重並未受到明顯的影響。75-S-1-4 與「黑葉」兩者種子重沒有差異；雖然 4 年的試驗結果皆顯示果肉重以 75-S-1-4 顯著較高，但兩品種之果肉率卻相近，此與 75-S-1-4 果皮較重有關；75-S-1-4 有 13%至 20%的焦核率，「黑葉」則無；兩者之可溶性固形物差異不大，約在 17°Brix 至 19°Brix，75-S-1-4 的酸度頗為穩定，維持在 0.12%至 0.16%，「黑葉」則在 0.13%至 0.19%。75-S-1-4 之採收期在 6 月底至 7 月初，較「黑葉」晚 11 至 22 天。至於單株產量，於民國 91 年 75-S-1-4 與「黑葉」兩者之間沒有差異，但在民國 92 年 75-S-1-4 卻是「黑葉」的兩倍。民國 93 年至 94 年則因為合作農友無法配合，而未記錄產量。本試驗區之「糯米糍」只有民國 92 年有結果，資料顯示糯米糍之果重與果肉重分別只有 75-S-1-4 之 74%及 67%，唯果肉率卻顯著較高，此與其具有約 64%之焦核率有關，「糯米糍」之可溶性固形物顯著較「黑葉」及 75-S-1-4 為高，酸度卻較低，至於產量則僅約 75-S-1-4 之 25%。

高雄試區試驗：75-S-1-4 之單果重、果皮重、果肉重及可溶性固形物皆顯著較「玉荷包」為高，於種子重、焦核率及酸度等項目與「玉荷包」無差異，而果肉率則是顯著較「玉荷包」為低；75-S-1-4 之果皮顏色為鮮紅色，「玉荷包」則為紅色帶微綠；至於採收期，兩品種相差約 1 個月，75-S-1-4 為 6 月下旬，「玉荷包」則為 5 月下旬 (表 4)。

「台農 3 號玫瑰紅」與「黑葉」、「桂味」及「糯米糍」植物性狀之差異性

我國自民國 93 年以後，公務機關育種規定回歸「植物品種及種苗法」，只要該法有公告種類，申請植物品種權時須填寫植物品種性狀檢定報告書，以證明申請品種與對照品種具有可區別性。對照品種一定要選擇形態上與申請品種最接近的品種，而非如品系種比較試驗及區域試驗般選擇最主要之栽培品種。

表 3. 雲林古坑試區荔枝品種果實性狀、單株產量及採收期比較

Table 3. Comparisons of fruit characteristics, yield and harvest dates among litchi Tainung No.3 Rose red (75-S-1-4), Hak Yip, and No Mi Tsz at Yun Lin Ku Keng regional trial [z]

Year	Selection/Variety	FW [y] (g)	PW (g)	AW (g)	SeW (g)	AP (%)	CS (%)	TSS (°Brix)	TA (%)	PC	Yield (k/p)	HD (m/d)
2002	75-S-1-4	22.6 a [x]	5.1 a	15.2 a	2.3 a	67.6 b	14 a	17.3 a	0.16 b	Bright red	16.0 a	6/26
	Hak Yip	15.9 b	2.7 b	11.3 b	1.9 a	71.3 a	0 b	18.2 a	0.20 a	Dark red	19.0 a	6/04
2003	75-S-1-4	23.0 a	4.0 a	17.0 a	2.0 a	73.8 b	13 b	18.7 b	0.15 a	Bright red	39.4 a	6/28
	Hak Yip	20.4 b	2.9 b	15.2 b	2.2 a	74.5 b	0 c	17.9 c	0.15 a	Dark red	18.0 b	6/17
	No Mi Tsz	17.0 c	2.9 b	11.4 c	1.0 b	77.7 a	64 a	20.0 a	0.11 b	Light red	10.4 c	7/03
2004	75-S-1-4	25.9 a	4.5 a	19.1 a	2.4 a	73.6 a	5 a	18.4 a	0.15 a	Bright red	-	7/04
	Hak Yip	21.1 b	3.3 b	15.7 b	2.1 a	74.4 a	0 b	17.1 b	0.12 a	Dark red	-	6/13
2005	75-S-1-4	26.5 a	4.6 a	19.8 a	2.1 a	75.2 a	22 a	18.6 a	0.12 a	Bright red	-	7/07
	Hak Yip	19.5 b	2.7 b	14.4 b	2.5 a	73.7 b	0 b	18.3 a	0.13 a	Dark red	-	6/24

[z] The material for trails were 5 years old air layer plants in 2002.
[y] Abbreviation, FW: Fruit weight; PW: Peel weight; AW: Aril weight; SeW: Seed weight; AP: Aril percentage; CS: Chicken tongue seed percentage; TSS: Total soluble solids; TA: Titratable acidity; PC: Peel color; HD: Harvesting date; k/p: kg/plant; m/d: month/day.
[x] Means followed by the same letters at the same column within the same year were not significantly different at 5% level by LSD test.

表 4. 民國 94 年期高雄杉林試區荔枝品系種果實性狀及採收期比較

Table 4. Comparisons of fruit characteristics and harvest dates between litchi Tainung No.3 Rose red (75-S-1-4) and Yu Her Bau at Kao Hsiung Shan Lin regional trial in 2005 [z]

Selection/Variety	FW [y] (g)	PW (g)	AW (g)	SeW (g)	AP (%)	CS (%)	TSS (˚Brix)	TA (%)	PC	HD (m/d)
75-S-1-4	29.1 a [x]	6.3 a	21.8 a	1.0 a	74.9 b	73 a	19.4 a	0.17 a	Bright red	6/22
Yu Her Bau	24.6 b	4.5 b	18.6 b	0.9 a	77.6 a	75 a	17.0 b	0.17 a	Red with mild green	5/27

[z] Tainung No.3 were grafted in 2002, the root stocks were 5 years old 'Nanshi Early' air layer plants. 'Yu Her Bau' were 5 years old air layer plants in 2002.
[y] Abbreviation, FW: Fruit weight; PW: Peel weight; AW: Aril weight; SeW: Seed weight; AP: Aril percentage; CS: Chicken tongue seed percentage; TSS: Total soluble solids; TA: Titratable acidity; PC: Peel color; HD: Harvesting date; m/d: month/day.
[x] Means followed by the same letters at the same column were not significantly different at 5% level by LSD test.

與其他商業栽培品種相較，「台農 3 號」整體之植物性狀與「黑葉」最為接近，其次為「糯米糍」與「桂味」，這 4 個品種之重要植物性狀及差異性狀如表 5，「台農 3 號玫瑰紅」與「黑葉」、「糯米糍」及「桂味」分別計有 21、21、27 項性狀具可區別性，其中重要差異如下：(1) 葉片：「台農 3 號」與「黑葉」之小葉形狀為披針形，「糯米糍」為長橢圓形，「桂味」為橢圓形，「台農 3 號」之小葉葉緣姿態為波浪紋，「黑葉」為平展，「糯米糍」及「桂味」為向內卷。(2) 花：「台農 3 號」之花序最長，其次為「黑葉」。「台農 3 號」及「糯米糍」之雌蕊柱頭形狀為圓卷裂，「黑葉」與「桂味」為微卷裂。(3) 果實：「台農 3 號」之果實最大，其次為「黑葉」；「台農 3 號」及「黑葉」之果形為心形，「糯米糍」與「桂味」為近圓球形；「台農 3 號」及「桂味」之果皮色澤為鮮紅，「糯米糍」為淡紅，「黑葉」則為暗紅；「台農 3 號」之果棘呈圓鈍形，「黑葉」及「桂味」為平滑，「糯米糍」則呈錐尖狀突起。「台農 3 號」縫合線明顯，果皮易從縫合線剝開，剝開時果汁不沾手，「黑葉」縫合線不明顯，「桂味」與「糯米糍」則縫合線明顯，然後三者之果皮均不易從縫合線剝開，且剝開時果汁會沾手。「台農 3 號」之果肉質地最 Q，其次依序為「糯米糍」、「黑葉」及「桂味」。

討　論

我國荔枝產業因栽培品種較單一化而導致產銷失調的問題，早在民國 70 年代已日趨嚴重 (Yen *et al.* 1984)，在民國 77 年僅「黑葉」單一品種就佔了荔枝栽培總面積之 95%以上，這時期學者專家曾向農政單位提出南部地區改種植早熟品種，而中部地區種植晚熟品種的構想，希望能藉著善用南北緯度不同所形成的氣候差異及品種特性延長分散我國荔枝產期 (Yen 1994)，而此後農政單位也確實朝此方向規劃推廣。然時至今日我國荔枝產業產銷失調的問題依然嚴重，若檢視現有荔枝品種佔栽培面積的比例，栽培品種仍以「黑葉」居多，約佔總栽培面積 79%，「玉荷包」約 24%次之 (Hsu 2008)，「糯米糍」約 1.2% (Chang 2008)，其餘品種合計約佔 5.8%。因此，這 20 年來「黑葉」佔栽培面積比例所減少之 16%幾乎都是南部的荔枝果園，由「黑葉」更改為「玉荷包」所致。

中部荔枝果農之所以不願意將「黑葉」更改為晚熟品種的主因，是現有栽培品種中，沒有兼具質優及產量高而穩定的品種。這 20 年來農政單位所推廣的晚熟品種，主要是「糯米糍」，其次是「桂味」。惟「糯米糍」存有開花不易、著果不穩、易裂果及焦核率不穩定等四個問題 (Chang 2008; Chang *et al.* 2006)，雖經研究人員多年努力仍未能克服 (Chang 1999; Chang 2004; Chang & Lin 2004; Chang 2008)，因此，遲遲無法穩定生產。至於「桂味」產量雖高，但不穩定，品質亦略差 (Yen 1984; Yen 1995; Teng *et al.* 2005; Chang *et al.* 2008)，導致農友缺乏更新此品種的意願。

隨著「台農 3 號玫瑰紅」之育成，我國荔枝產業因缺少質優且高而穩產之晚熟品種，導致品種無法多元化的問題，將可獲得部份的解決。根據多年的試驗結果，「台農 3 號」之產期較黑葉晚 7–27 天，而較「玉荷包」晚約 1 個月為晚熟種，果實品質顯著較「黑葉」及「桂味」優良，產量與「黑葉」相近而顯著高於「糯米糍」且穩定 (表 2、3)。

「台農 3 號」之焦核率並不穩定且在試區間差異大。在品系種比較試區僅 0%至 5% (表 2)，在雲林試區為 5%至 22%，但在高雄試區則高達 73% (表 3)，然以焦核率著稱之「糯米糍」其焦核率在本系列試驗中，焦核率亦有 0%至 64%的變異。荔枝焦核品種焦核率不穩定的原因，目前較可能的假說為花粉效應 (Pollen parent effect)，即非焦核品種、授粉於焦核品種所致，在以色列，以非焦核品種‘Mauritius’授粉

表 5. 台農 3 號玫瑰紅荔枝與黑葉、糯米糍及桂味之氣候期與植物性狀比較 (民國 92 年至 97 年，調查於農業試驗所嘉義分所)

Table 5. Phenology and characteristics of 'Tainung No.3 Rose red' and three comparable varieties tested at Chia Yi Agriculture Experimental station, TARI (2003 to 2008)

Phenology and Characteristios		Tainung No.3 Rose red	Hak Yip	No Mi Tsz	Kwai Mi
Tree	Crown shape	Dome shaped	Dome shaped	Dome shaped	Dome shaped
	Trunk surface colour	Grey	Grey	Grey	Grey
	Tree growth habit	Spreading	Spreading	Spreading	Spreading
	Tree vigour	Vigorous	Vigorous	**Medium**[z]	**Medium**
Leaf	Leaflet number	3–4	3–4	3–4	3–4
	Leaflet length (cm)	12.8 ± 2.4	12.7 ± 1.9	12.0 ± 1.2	**11.6 ± 1.5**
	Leaflet width (cm)	4.1 ± 0.6	3.7 ± 0.5	4.2 ± 0.4	**4.5 ± 0.6**
	Length/ width of leaflet	3.1 ± 0.5	3.4 ± 0.6	**2.9 ± 0.1**	**2.6 ± 0.3**
	New leaflet colour	Light red	**Brown red**	**Brown red**	**Brown red**
	Mature leaflet surface colour	Dark green	Dark green	Dark green	Dark green
	Leaflet blade shape	Lanceolate	Lanceolate	**Long-elliptic**	**Elliptic**
	Leaflet apex shape	Acuminate	**Long-acuminate**	Acuminate	**Acate**
	Leaflet base shape	Cuneate	Cuneate	**Oblique**	**Broad-cuneate**
	Leaflet margin	Undulate	**Entire**	**Curling inward**	**Curling inward**
Flower	Length of inflorescence (cm)	41.9 ± 8.9	**30.7 ± 0.5**	**20.1 ± 5.0**	**16.2 ± 3.8**
	Flower bud density	Sparse	Sparse	Sparse	Sparse
	Split number of stigma	2	2	2	2–3
	Attitude of splitting stigma	Rolling	**Arc-shaped**	Rolling	**Arc-shaped**
	Colour of deteriorational stigma top	Cream color	Cream color	**Sorrel**	**Sorrel**
Fruit	Weight of per fruit (g)	25.0 ± 2.2	**19.5 ± 2.4**	**17.0 ± 3.3**	**16.8 ± 3.6**
	Uniformity	Uniform	Uniform	Uniform	Uniform
	Fruit shape	Cordate	Cordate	**Nearly globe-shaped**	**Nearly globe-shaped**
	Mature fruit peel color	Bright red	**Dark red**	**Light red**	Bright red
	Shape of protuberance	Protruding	**Even**	**Sharp-protruding**	**Even**
	Presence of suture	Showing obviously	**Unobviously**	Showing obviously	Showing obviously
	Peel weight (g)	4.8 ± 0.5	**3.0 ± 0.5**	**2.9 ± 0.7**	**3.1 ± 0.4**
	Color of aril	Waxy white	Waxy white	Waxy white	Waxy white
	Aril texture	Firm	**Crisp**	Firm	**Soft**
	Aril juiciness	Medium	Medium	Medium	Medium
	Aril flavor	Strong sweet	Strong sweet	Strong sweet	**Acid**
	Aril fragrance	Rose fragrant	**Absent**	**Light fragrant**	**Light fragrant**
	Edible percentage of fruit (%)	71.1 ± 2.7	73.5 ± 2.2	**77.7 ± 5.6**	**67.0 ± 0.05**
	Total soluble solids content (°Brix)	18.3 ± 1.3	**16.6 ± 1.2**	**20.0 ± 0.8**	**17.1 ± 1.5**
	Quality	Excellent	**Medium**	Excellent	**Medium**
Seed	Weight per seed (g)	2.4 ± 0.6	2.2 ± 0.2	**1.0 ± 0.9**	2.2 ± 0.4
	Percentage of chicken tongue seed fruits (%)	20	**0**	**60**	**0**
	Seed coat color	Brown	Brown	**Deep brown**	**Deep brown**
	Shape of seed	Elliptic	Elliptic	**Chicken tongue**	Elliptic
Phenology	Date of male flowering	Late March	**Middle March**	**Early April**	**Early April**
	Date of female flowering	Early April	**Late March**	**Middle April**	**Middle April**
	Date of functional male flowering	Middle April	**Early April**	Middle April	Middle April
	Date of late flowering	Middle April	**Early April**	Middle April	Middle April
	Date of fruit maturity	Late June to early July	**Middle June**	Late June to early July	Late June to early July
Disease reaction	Downy blight	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility
Pest reaction	Litchi fruit borer	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility	Susceptibility
Storage (5℃)	Day of storage (5℃)	21	21	**14**	21

[z] The words with under line mean the characteristic of this variety is different from Tainung No.3.

於焦核品種‘Floridan’，將導致‘Floridan’之著果率及種子重量均顯著增加 (Stern *et al.* 1993)，在中國大陸，以 7 種非焦核品種授粉於焦核品種‘Gui Wei’，亦得到類似的結果 (Xiang *et al.* 2001)，因此研判這些焦核品種可能具有自交弱勢 (inbreeding depression) 的特徵 (Stern & Gazit 2003)。本系列試驗中，「台農 3 號」焦核率不穩的原因，推測亦應屬花粉效應，主要理由是焦核率在不同地區所呈現之差異，遠大於同一地區不同年份之差異。若分析各試區之環境更可說明，品系種比較試區位於本所嘉義分所荔枝園，其相鄰的試驗園有荔枝自然授粉園，園內含 15 個荔枝品種，及荔枝實生選種園，園內品種系多達數百個；而雲林試區的果園佔地 5 分，除園內「台農 3 號」、「黑葉」、「糯米糍」外，尚有 7 個品種系，反觀高雄試區的果園佔地 8 ha，園內除了供試的「台農 3 號玫瑰紅」及幾株尚在試驗的品系外，其餘為「玉荷包」，而「玉荷包」不僅為焦核品種，且花期較「台農 3 號」早約 1 個月，由於高雄試區僅一年的試驗結果，因此「台農 3 號」的焦核性狀仍有進一步探討的必要。

「台農 3 號玫瑰紅」特性

綜合各試區試驗結果及品種性狀之檢定 (表 5)，顯示「台農 3 號玫瑰紅」具有如下特性：(1) 樹形為圓頭形、開張，生長勢強，枝條疏而長。(2) 小葉形狀為披針形，小葉長約 13 cm，寬約 4 cm，小葉形態邊緣具有明顯之波浪紋 (圖 1A)，成熟葉片顏色為濃綠色，新梢葉片則為淡紅色。(3) 花穗為圓錐花序，花穗長度常達 40 cm 以上，花穗雖長但花枝稀疏 (圖 1B)；雌蕊柱頭形狀成圓卷裂 (圖 1C)。(4) 果實品質優良，大果，果重可達 30 g，一般為 25 g 左右，果實為心臟形 (圖 2A)。(5) 果皮顏色如紅玫瑰般的鮮紅美豔 (圖 2B)，果棘圓鈍，果皮縫合線明顯，縫合線兩邊的果皮會略微突起，果皮易從縫合線剝開，且剝開後果肉易從果蒂脫落，因此食用時，果肉及果汁不沾手，為其一大特點 (圖 2C)。(6) 果肉細緻，口感極 Q，在口中咬勁十足，果肉具有如玫瑰般的特殊香氣，可溶性固形物介於 17°Brix 至 20°Brix 之間，大多數在 18°Brix 以上。(7) 產量高，6 年生高壓苗，單株產量達 30 kg 以上，估計每公頃可達 10,000 kg 以上，為現有晚熟品種中產量最高者 (圖 2D)。

本所嘉義分所培育的荔枝優良品種「台農 3 號玫瑰紅」產期晚於「黑葉」，果實明顯較「黑葉」、「糯米糍」及「桂味」為大，而與「玉荷包」相近；果色鮮紅美豔，很容易吸引消費者的目光，而容易剝皮，果汁不沾手的特性，亦符合市場食用方便快速安全衛生的潮流，對年輕的一代尤具吸引力。肉質 Q，咬勁十足，可溶性固形物高，果實品質佳與傳統上對好荔枝品種的形象相符，此外具有玫瑰的特殊香氣也迎合了消費者求新求變的期待。而產量高且栽培容易之特性，可使農友獲得較高的利潤。本品種的推出將可部份取代「黑葉」有助於紓解我國荔枝產業長期以來因商業栽培品種過於單一化所導致的產銷失衡的問題。

誌　謝

本研究承蒙行政院農業委員會經費補助，嘉義分所楊宏仁主任指導病害調查，洪士程先生進行蟲害調查，作物組王怡玎博士進行貯藏試驗，方明義先生、邱顯政先生、劉茂南先生、魏佩瑩小姐協助田間管理，葉育琪小姐協助果實品質分析、育種資料整理，劉正信先生及陳善命先生協助區域試驗，在此一併誌謝。

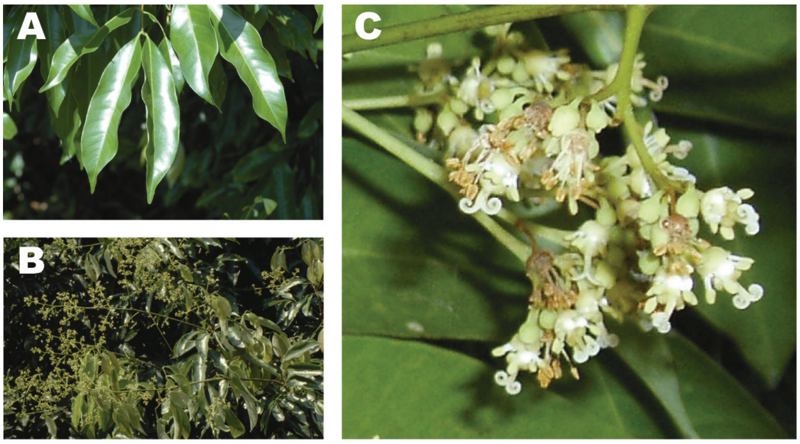


圖 1. 荔枝台農 3 號之植株外觀。(A) 波浪紋葉緣；(B) 長而疏之花序；(C) 圓卷裂之雌蕊柱頭。

Fig 1. The plant appearance of litchi Tainung No.3.　(A) The leaflet margin is undulate; (B) The flower bud density is long and sparse; (C) The attitude of splitting stigma is rolling.

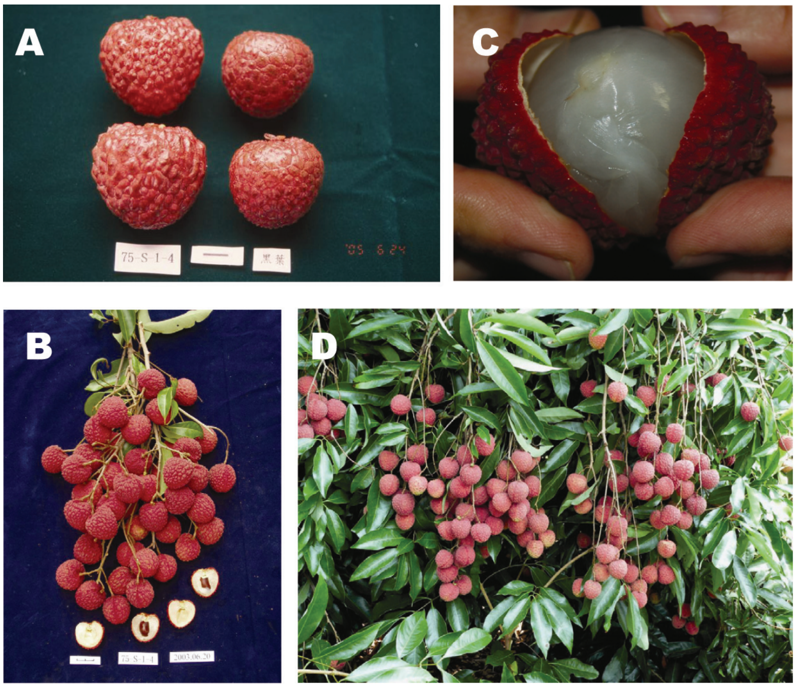


圖 2. 荔枝台農 3 號之果實特性 (A) 台農 3 號荔枝 (左)、黑葉 (右)；(B) 果皮鮮紅美豔；(C) 果肉易從縫合線剝開；(D) 產量高。

Fig 2. The characteristics fruit of litchi Tainung No.3.　(A) Tainung No.3 (left) is bigger than ‘Hak Yip’ (right); (B) the peel of litchi Tainung No.3 (75-S-1-4) is rose red in color; (C) the fruit is easy to rip the peel off the aril from the surture; (D) the yield is high.

引用文獻 (Literature cited)

Chang, J. C. 2004. Studies on Fruit Set in 'Yu Her Pau' and 'No Mai Tsz' (73-S-20) Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). Ph. D. Dissertation. Graduate Institute of Horticulture National Taiwan University. 317 pp. (in Chinese with English abstract)

Chang, J. C. and T. S. Lin. 2004. Growth of developing 'No Mai Tsz' litchi fruits. J. Agri. Assoc. China 5:535–550. (in Chinese with English abstract)

Chang, J. C. 2008. Physiological aspect and research progress on improvement of 'No Mai Tsz (73-S-20)' litchi production in Taiwan. p.95–114. *in* the Proceedings of Symposium on Lychee Industry and Development in Taiwan. Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung. (in Chinese with English abstract)

Chang, J. C., T. S. Lin, C. R. Yen, and J. W. Chang. 2006. Litchi Cultivation and Improvement in Taiwan: An Overview. 27th International Horticultural Congress Abstracts. Seoul, Korea. 458 pp.

Chang, J. W. 1999. Regulation of Flowering in Litchi. Ph. D. Dissertation. Graduate Institute of Horticulture National Taiwan University. 136 pp. (in Chinese with English abstract)

Chang, J. W., Y. S. Teng, and C. R. Yen. 2008. Taiwan litchi breeding. p.65–78. *in* the Proceedings of Symposium on Lychee Industry and Development in Taiwan. Department of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung. (in Chinese with English abstract)

Chao, C. N. 1999. Litchi. p.1–9. *in*: Compendium of Crop Cultivars in Taiwan. Ever-green Fruits. Council of Agricultural, Executive Yuan. Taipei. Taiwan. (in Chinese)

Hsu, T. L. 2008. Lychee production in Taiwan. p.5–11. *in* the Proceedings of Symposium on Lychee Industry and Development in Taiwan. Dept. of Plant Industry, National Pingtung University of Science and Technology. Pingtung. (in Chinese with English abstract)

Huang, C. C., Y. T. Wang, and C. H. Pan. 1991. Effect of storage temperature on the color and quality of litchi fruit. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 37:141–152.

Stern, R. A., S. Gazit, R. El-Batsri, and C. Degani. 1993. Pollen parent effect on outcrossing rate, yield, and fruit characteristics of 'Floridian' and 'Mauritius' lychee. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 118:109–114.

Stern, R. A. and S. Gazit. 2003. The reproductive biology of the lychee. Hort. Rev. 28:393–453.

Teng, Y. S., J. W. Chang, and Y. T. Wang. 2005. Litchi. p.39–52. *in*: Taiwan Agricultural Encyclopedia 3rd. edition, crop edition, vol 2 Council of Agricultural, Executive Yuan. Taipei. Taiwan. (in Chinese)

Teng, Y. S. 2006. How to extend fruit production seasons in'Yu Her Pau'litchi. J. Technol. Serv. Taiwan Agric. Res. Inst. 67:5–8. (in Chinese)

Xiang, X., L. Ou, Y. Qiu, P. Yuan, and J. Chen. 2001. Embryo abortion, and pollen parent effects in Nuomici, and Guiwei litchi. Acta Hort. 558: 257–260.

Yen, C. R., Y. W. Laio, and Y. J. Tien. 1984. The cultivars of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) and their improvement in Taiwan. J. Chinese Soc. Hort. Sci. 30:210–222. (in Chinese with English abstract)

Yen, C. R. 1995. Litchi. p.35–42. *in*: Taiwan Agricultural Encyclopedia, 2nd ed. crop edition, vol 2. (Harvest Farm Magazine, ed.) Council of Agricultural, Execntive Yuan. Taipei. Taiwan. (in Chinese)

A New Variety of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) 'Tainung No.3 Rose Red' [1]

Jer-Way Chang[2,4], Chung-Ruey Yen[3], Hsin-Tszu Hsu[2], Wan-Ling Wang[2], Wu-Hsiung Tsai[2], Yung-Hsiung Cheng[2], and Chao-Chi Ho[2]

Abstract

Chang, J. W., C. R. Yen, H. T. Hsu, W. L. Wang, W. H. Tsai, Y. H. Cheng, and C. C. Ho. 2009. A new variety of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) 'Tainung No.3 Rose red'. J. Taiwan Agric. Res. 58:208–218.

A new litchi variety 'Tainung No.3 Rose Red' was bred by the Chia Yi Agricultural Experiment station, Taiwan Agricultural Research Institute, and released on December, 2006. The name 'Rose Red' litchi refers to the fruit with rose fragrance of aril and red rose color of peel. The fruit weight, seed weight, aril percentage, total soluble solids and titratable acidity of 'Tainung No.3 Rose Red' are 23–29 g, 1.0–3.2 g, 67–75%, 17.4–20.2°Brix and 0.12–0.17%, respectively, better then the control cultivar 'Hak Yip'. The flesh is firm. The peel segments are swelling and the protuberances are protruding. The surture is obvious. It is easy to rip the peel off the aril from the suture. The harvest period is from late June to early July. It is 7–27 days later than that of 'Hak Yip' which is the major cultivar in Taiwan. It is easy to plant 'Tainung No.3 Rose red' in every litchi producing region in Taiwan. With the better fruit quality and comparably higher yield, 'Tainung No.3 Rose red' is an exciting candidate for litchi growers looking for new varieties to replace 'Hak Yip' and to exploit the economic potential of litchi production in Taiwan.

Key words: Litchi, Tainung No.3, Rose Red, Breeding.

---

1. Contribution No.2367 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: September 8, 2009.
2. Respectively, Associate Horticulturist, Senior Horticulturist and Head, Assistant Horticulturist, Senior Plant Pathologist and Director, Previous Senior Plant Pathologist and Previous Director, Previous Technician, Chia Yi Agricultural Experiment Station, TARI, Taiwan, ROC.
3. Professor and Dean of College of Agriculture, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtun, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: jerway@dns.caes.gov.tw; Fax: (05)2773630.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 58(3):219–233 (2009)

栽培稻 (*Oryza sativa*) 與野生稻 (*O. australiensis*) 導入系統之建立及其產量相關性狀之表現 [1]

李長沛[2,5] 古新梅[3] 胡澤寬[3] 陳治官[4] 賴明信[4] 曾清山[2] 陳哲仁[2] 曾東海[2]

摘　要

李長沛、古新梅、胡澤寬、陳治官、賴明信、曾清山、陳哲仁、曾東海。2009。栽培稻 (*Oryza sativa*) 與野生稻 (*O. australiensis*) 導入系統之建立及其產量相關性狀之表現。台灣農業研究 58:219–233。

利用野生稻建立的導入系統 (introgression lines; ILs) 為育種增進及遺傳分析的良好材料，本試驗擬在粳稻背景下，測試栽培稻與澳洲野生稻 (*Oryza australiensis*) 導入系統的可行性。以 5 個稉型栽培品種 (*O. sativa*) 與從 IRRI 引進之 3 個 *O. australiensis* 系統 (IRGC100882、101379、101410) 進行雜交並行胚拯救培養，依雜交組合的不同，雜交可稔性 (seed set) 介於 2.3–54.6%之間，胚拯救培養成活率則為 0 至 83.3%。調查台農 67 號 (TNG67) 與 3 個野生稻系統的雜種 F_1，除 TNG67 × IRGC101410 表現出雜種弱勢，其餘兩雜交組合 F_1 可正常生長，但均不具稔性。經回交後僅 TNG67 × IRGC 100882 可獲得回交種子，所得 BC_1F_1 植株均不稔，但於 BC_2F_1 則可獲得部分可稔植株，第 1 次和第 2 次回交的成功率均低 (< 0.98%)，經第 3 次回交的成功率平均達 46%。評估多次回交之 F_1 及 F_2 世代的表現，發現於 BC_2F_2 和 BC_3F_1 可得正常稔實植株，而且各性狀的變異大，可作為選拔之適期。成立的系統經外表型選拔固定至 BC_3F_7，獲得 111 個系統，有 8 個 (7%) 系統產量較輪迴親本 TNG67 增產 10%以上，最高達 23%。在其他產量相關性狀上，各性狀表現最佳的系統與輪迴親相比，增加幅度從千粒重的 15.7%至每穗粒數的 78%。這些經由多次回交建立的種間雜交導入系統，可做為中間親本並將進一步分析其遺傳組成。

關鍵詞：栽培稻、野生稻、種間雜交、回交、胚拯救培養、導入系統、產量性狀。

前　言

稻屬包括兩栽培種 (*Oryza sativa* 及 *O. glaberrima*) 和 22 個野生稻種，依彼此間雜交親和性及染色體配對的表現可分為 10 種染色體組 (AA、BB、 BBCC、CC、CCDD、EE、FF、GG、HHJJ 及 HHKK)，大多數野生稻種具有改進栽培品種對環境逆境、生物逆境甚至提

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2369 號。接受日期：98 年 9 月 15 日。
2. 本所生物技術組助理研究員、助理研究員、聘用助理研究員、副研究員。台灣　台中縣　霧峰鄉。
3. 國立中興大學農藝系助理教授、教授。台灣　台中市。
4. 本所作物組副研究員。台灣　台中縣　霧峰鄉。
5. 通訊作者，電子郵件：charngpei@tari.gov.tw；傳真機：(04)23302806。

高產量的潛力 (Brar 2005)。在種源的利用上，Khush (1997) 根據 Harlan & de Wet (1971) 提出的基因庫概念，將容易與栽培稻雜交成功，透過傳統育種方法就可加以利用的各類 AA 染色體組的栽培種及野生稻種，歸類為第一級基因庫；與栽培稻可以雜交，但必須借助胚培養等特殊方式才能獲得雜種，且雜種具有高度的不稔性，回交成功率也低，歸類為第二級基因庫，主要有 *O. officinalis complex* (包括 BB、BBCC、CC、CCDD、EE、FF 野生稻種)；其他更遠緣的稻種則被歸為第三級基因庫。

栽培稻與相同染色體組 (AA) 的近緣野生稻種，透過傳統雜交及回交育種方式，已有許多將野生稻潛在優良特性 (Khush & Ling 1974; Lin & Yuan 1980; Huang *et al*. 1985; Khush *et al*. 1990) 成功導入栽培稻的實例。而屬於第二級基因庫的遠緣野生稻種雜交之後，雜子代經常有胚存活不易、胚乳容易退化的現象 (Chang 1978; Suputtitada 2000; Fu *et al*. 2009)，但經由胚拯救培養且可獲得雜種 F_1 植株 (Sitch *et al*. 1989)，並可以透過連續回交的方式，建立異源單價染色體增加系統 (Monosomic alien addition lines; MAALs) (Jena & Khush 1989; Kobayashi *et al*. 1992; Yasui *et al*. 1995; Jin *et al*. 2006; Li *et al*. 2008)，進而育成導入系統 (introgression line; ILs) 以利於進行目標性狀的分析或當作中間親本再利用。目前已有從這些遠緣的野生稻種中成功地導入抗病蟲害特性至栽培稻中的報告 (Jena & Kush 1990; Ye & Saxena 1990; Amante-Bordeos *et al*. 1992; Ishii *et al*. 1994; Mariam *et al*. 1996; Hirabayashi *et al*. 1998; Hirabayashi *et al*. 1999; Huang *et al*. 2001; Renganayaki *et al*. 2002; Yang *et al*. 2002)。

野生種源除在抗病、抗蟲特性廣受育種者利用外，在產量性狀的應用雖然常受限於雜種族群的分離異常、雜種 F_2 不稔性或是野生種原不良狀的強烈的連鎖，Tanksely *et al*. (1996) 認為經由多次回交建立的種間回交族群，雖然大多數系統的數量性狀表現不如輪迴親，但在少數系統中，由野生種而來的基因可以改善栽培種的數量性狀。Xiao *et al*. (1996) 證實由野生稻 *O. rufipogon* 可獲得增進雜種水稻產量的基因。越來越多的證據也顯示，種間雜交組合經多次回交栽培稻育成 ILs 為數量性狀分析的良好材料，並從中獲得許多與產量有關性狀的數量基因 (Xiao *et al*. 1998; Moncada *et al*. 2001; Masumoto *et al*. 2004; Tian *et al*. 2006; Tan *et al*. 2007; Masumizu *et al*. 2007; Rangel *et al*. 2008)。

野生稻 *O. australiensis* 為澳洲的原生稻種，主要分布在澳洲本島北部各州，具有 EE 染色體組，染色體組約為一般二倍體栽培稻種 (*O. sativa*) 的 2 倍 (Ohmido *et al*. 2005; Piegu *et al*. 2006)，育種利用上也因與栽培稻雜交困難，所得雜種高度不稔被歸類在第二級基因庫。菲律賓國際稻米研究所曾利用多倍體化的栽培稻 (AAAA) 與 *O. australiensis* 雜交，再回交二倍體栽培稻獲得回交植株，於 BC_2F_1 之後代，經褐飛蝨及白葉枯病檢定，並以分子標誌確認其抗性來自 *O. australiensis* 的第 12 對染色體 (Multani *et al*. 1994)，並從中獲得褐飛蝨抗性連鎖的分子標誌 (Ishii *et al*. 1994; Jena *et al*. 2006)。

為擴大台灣水稻栽培品種遺傳歧異度，增進野生稻種原的利用性，故本試驗就國內育成之日本型品種與野生稻 *O. australiesis* 系統雜交，探討栽培品種與 *O. australiensis* 雜交親和性，並試著建立回交族群，探討回交族群及經選拔所得系統在產量及產量相關性狀的表現，提供栽培稻與遠緣野生稻種間 ILs 材料作為將來進一步利用及研究。

材料與方法

為探討種間雜交的親和性本試驗以 5 個日本型品種高雄 141 號 (KH141)、台中 65 號 (TC65)、台中糯 70 號 (TCW70)、台粳 1 號 (TK1) 及台農 67 號 (TNG67) 等 5 個栽培稻為母本，

國際稻米研究所 (International Rice Research Institute; IRRI) 引進 EE 染色體組野生稻種 *Oryza australiensis* 系統 (IRGC100882, IRGC 101397, IRGC101410) 為父本，栽培稻分 3 批種植於田間，野生稻種植於溫室，野生稻 *O. australiensis* 在台灣台中的開花時間在下午 3–4 點 (Li *et al*. 1994)，因此雜交進行流程是於早上經除雄後之栽培稻親本，留至下午再行授粉，於授粉後 7–10 天計算雜交可稔率 (seed set %)，取雜交成功之種子經次氯酸鈉消毒 10 分鐘，於立體顯微鏡下挑出幼胚進行培養。培養基以 N6 無機鹽類及 MS 有機成分，添加 0.2 mg/L NAA、1 mg/L kinetin、3%蔗糖，1% 瓊脂，500 mg/L 水解酪蛋白 (casein hydrolysate)，pH = 5.7 (Lo *et al*. 1997)。

經胚培養及健化存活植株移植至田間，所得 F_1 植株再回交栽培稻，但均未能獲得回交種子，其中僅 TNG67 × IRGC100882 組合，其雜種植株於宿根兩年四期作之後，再行回交終於可得到回交後代。進一步探討該組合各回交可稔率，也以 1% IKI (Iodine Potassium Iodide) 浸染雜種及回交株之花藥，於顯微鏡下觀察花粉活性。並取幼穗觀察花粉母細胞觀察染色體配對情形，染色體觀察沿用 Chen & Wu (1982) 之方法。用以回交的植株則留宿根收取 F_2 種子或再行回交獲得多量的 $BCnF_1$ 種子，進而同時繁殖 BC_2F_2、BC_3F_1、BC_3F_2 及 BC_4F_1 世代，各族群種植株數分別為 183、402、259 及 112 株，於成熟期調查株高並單株分別取樣進行考種，其中由 BC_3F_1 收穫之單株成立系統，經 3 年 6 個期作的外表型選拔與固定，於 BC_3F_7 選出 111 個系統進行產量試驗及農藝性狀之評估。產量試驗每系統種植 60 株，以輪迴親本 TNG67 為對照，逢機排列，各兩重複，多本植，成熟後每重覆取 3 株進行考種，其餘株數混合收割評估產量並換算成公頃產量。

田間試驗栽種行株距為均為 28 cm × 16 cm，收穫考種方式均秤總重、稔實率重、計算稔實與不稔實粒數、穗數並量穗長，最後換算成稔實率 (稔實粒數 ÷ 總粒數 × 100%)、千粒重 (稔實粒重 ÷ 稔實粒數 × 1000)、每穗粒數 (總粒數 ÷ 穗數) 及穗著粒密度 (每穗粒數 ÷ 穗長)。

結　　果

種間雜交及回交親合性

栽培稻 5 個品種與野生稻 *O. australiensis* 3 個系統共進行 15 個雜交組合，得到雜交可稔率如表 1 所示，結果因栽培品種與野生稻系統之不同有很大差異，最低組合為 TCW70 × IRGC 100882 之 2.3%，最高為 TNG67 × IRGC101379 之 54.6%，而雜交成功獲得雜交種子的 15 個組合中，經胚拯救培養計有 12 個組合可獲得雜種 F_1 植株，發芽成活率因不同組合有很大的差異，變異為 0–83.3%。

雜交成功經胚培養存活的組合中，調查 TNG67 與 3 個野生稻所得雜種 F_1 植株的農藝性狀表現 (表 2)，TNG67 × IRGC100882 和 TNG67 × IRGC101379 兩組合 F_1 生育正常，雜種 F_1 株高、分蘗及穗長的表現介於兩親本之間。TNG67 × IRGC100882 雜種 F_1 葉長度較兩親本短但較兩親寬，TNG67 × IRGC101379 雜種 F_1 葉長偏向野生稻親本，葉寬則介於兩親之間。IRGC101410 為 *O. australiensis* 株型較矮分蘗多的系統，但與 TNG67 雜種 F_1 的株高偏向野生稻親本，分蘗數明顯較兩親少，穗出現退化之現象，有明顯的雜種弱勢表現。另外，TNG67 × IRGC100882 和 TNG67 × IRGC101379 兩組合 F_1 雜種花藥發育正常但花粉均不具活性 (圖 1a)，因此均無法獲得 F_2 種子。

經回交 TNG67 後發現 TNG67 × IRGC100882 可以獲得 BC_1F_1 種子，雜種 F_1 授粉後部份穎花也呈現子房膨大，但均無內容物，其雜

表 1. 栽培稻與野生稻雜交之可稔率與胚拯救培養成功率

Table 1. The percentage of crossability and embryo rescue between various *O. sativa and O. australiansis* cross combinations

Cross combination		Crossability			Embryo rescue culture		
Female (Cultivars)	Male (IRGC Acc. no.)	Pollination florets	Detached embryos	Seed set (%)	No. of embryo	No. of germination	Survival rate (%)
KH141	100882	81	6	7.4	2	1	50.0
TC65	100882	135	37	27.4	10	5	50.0
TCW70	100882	310	7	2.3	- ^{z}		
TK1	100882	89	4	4.5	4	3	75.0
TNG67	100882	491	79	16.1	43	27	62.8
Average				11.5			59.4
KH141	101379	103	5	4.9	-		
TC65	101379	43	6	14.0	6	5	83.3
TCW70	101379	175	9	5.1	-		
TK1	101379	144	29	20.1	27	7	25.9
TNG67	101379	262	143	54.6	37	28	75.7
Average				19.7			61.6
KH141	101410	92	10	10.9	5	0	0.0
TC65	101410	157	34	21.7	25	6	24.0
TCW70	101410	174	48	27.6	27	3	11.1
TK1	101410	226	41	18.1	8	2	25.0
TNG67	101410	422	95	22.5	24	8	33.3
Average				20.2			18.7

^{z} Not recorded.

表 2. 栽培稻 TNG67 × 野生稻 *Oryza australiensis* 雜種及其親本之植株性狀

Table 2. Characteristics of the F_1 hybrids from cultivated rice (Japonica type cv. TNG67) and *Oryza austaliensis* strains

Parents/Hybrids	Plant height (cm)	Tiller number	Panicle length (cm)	Leaf length (cm)	Leaf width (cm)	Awing length (cm)
TNG67	101	15	20.8	38.5	1.3	Awnless
IRGC100882	117	5	34.0	50.0	1.5	3.8
TNG67 × IRGC100882	112	12	26.8	36.0	1.6	5.6
IRGC101397	114	10	32.0	47.0	1.5	3.7
TNG67 × IRGC101379	112	14	29.0	46.4	1.4	7.1
IRGC101410	60	21	16.0	36.0	1.5	3.1
TNG67 × IRGC101410	63	7	- ^{z}	34.6	0.8	Awnless

^{z} No panicle produced.

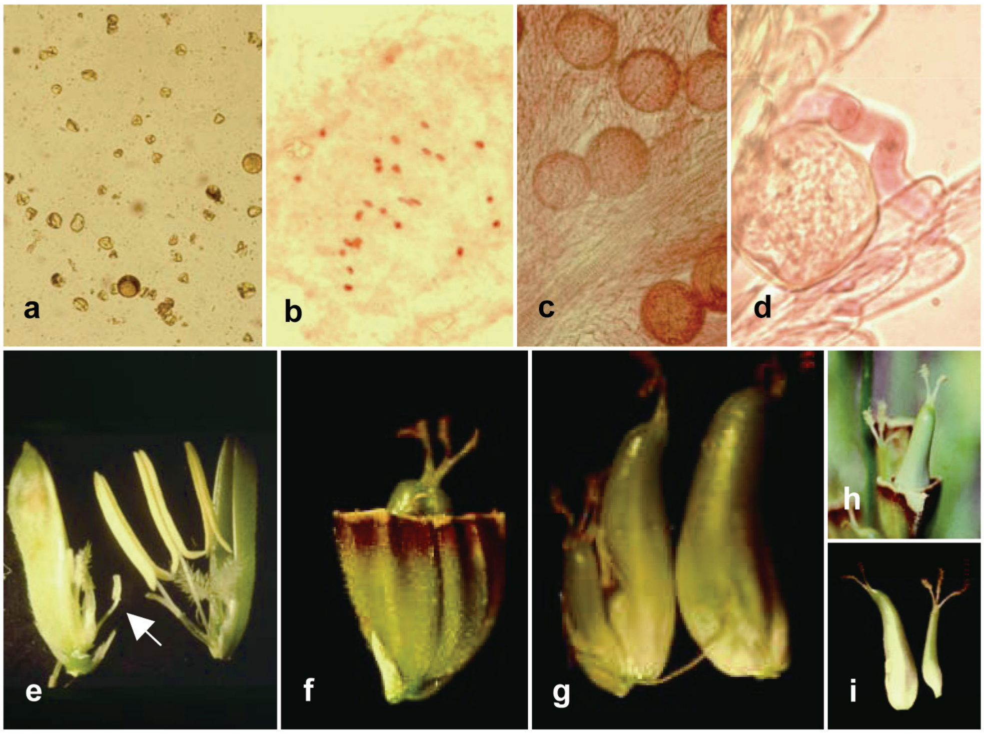


圖 1. 栽培稻 TNG67 × 野生稻 *O. australiensis* (IRGC100882) 雜交及回交後代異常之表現。(a) 雜種 F_1 花粉敗育現象；(b) 雜種 F_1 花粉母細胞減數分裂後期 (meiotic anaphase) 配對不正常 (4 II + 16 I)；(c) 輪迴親花粉粒於雜種 F_1 柱頭不發芽；(d) 輪迴親花粉粒於雜種 F_1 柱頭發芽後伸長受阻；(e) BC_2F_1 花藥發育不完全 (箭頭處)；(f–i) BC_2F_1 授粉後種子發育異常。

Fig. 1. The abnormal phenomena were observed in the hybrids and backcross generation from the combination of *Oryza sativa* (cv. TNG67) × *O. australiensis* (IRGC100882). (a) Pollen abortion in F_1 hybrid; (b) Meiotic anaphase showing the 4 bivalents and 16 univalents in F_1 hybrids; (c) Fail of germination in the F_1 stigma when pollinating with TNG67 pollens; (d) The growth of pollen tubes was inhibited in the F_1 stigma; (e) Immature of BC_2F_1 anther (arrow); (f–i) anomalistic growth of BC_2F_1 seeds when pollinating with TNG67 pollens.

交可稔率僅 0.08% (表 3)，BC_1F_1 植株也均不稔，觀察花粉母細胞減數分裂中期 metaphase I 發現染色體配對不完全之現象 (圖 1b)。第二次回交的結果也僅 0.98% (表 3)，但於 BC_2F_1 可獲得部分可稔植株，有多數株型均呈現異常，如株高變矮、株型緊湊、葉片厚且濃綠、劍葉長或短、穗長、粒短圓；中高株高、葉色淡細長而下垂、穗型散 (圖 2)；甚至有花器構造異常之現象，如花藥發育不完全 (圖 1e)，柱頭異常 (呈三叉狀) 等植株 (圖 1 f–h)，而使得 BC_2F_1 植株授粉後，種子發育表現異常之現象如穎花內有雙子情形 (圖 1g)， 雖然 BC_2F_1 在株型上表現與兩親本有明顯差異，且大部分植株仍呈現不稔性，但已可獲得部份可稔植株，最高可達 44%，平均 5.8%。經第三次回交終於可獲得較多 BC_3F_1 種子，雜交可稔率達 45.95% (表 3)。

回交後裔族群之建立及性狀表現

經回交之 BC_2F_1、BC_3F_1 植株已有部分可稔株可供成立回交族群之用，因此留宿根及收穫

表 3. 栽培稻 TNG67 × 野生稻 *O. australiensis* (IRGC100882) 雜種回交之可稔率

Table. The crossability data from the backcross generation of TNG67 × *O. australiensis* (IRGC100882) cross combination

Generation	No. of pollination forest	No. of detached embryos	Seed set (%)
BC_1F_1	30,859	26	0.08
BC_2F_1	23,370	230	0.98
BC_3F_1	803	369	45.95

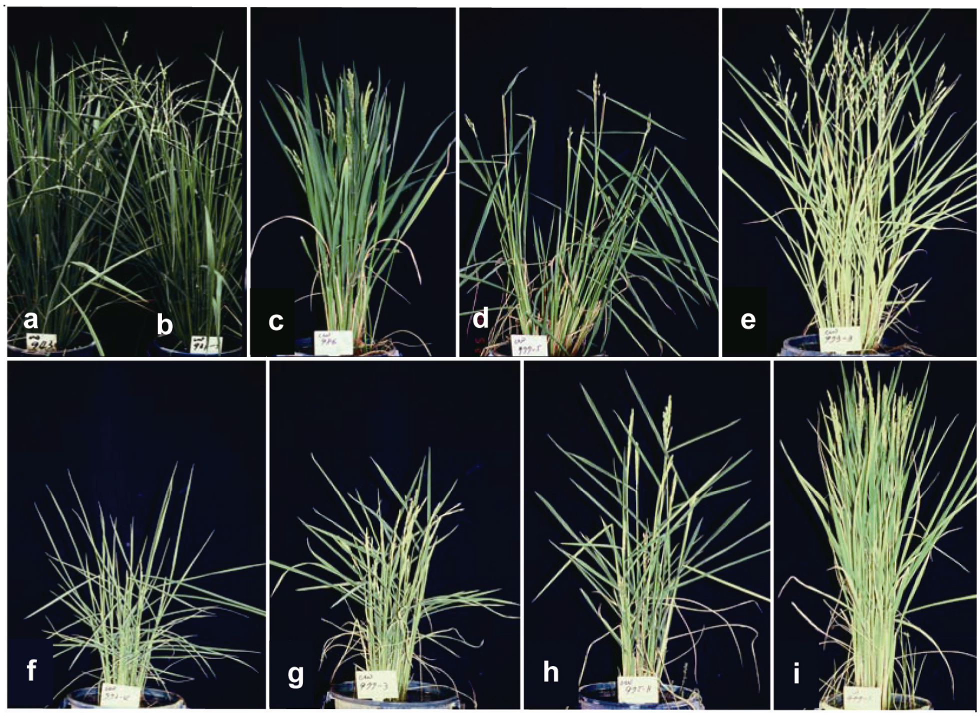


圖 2. 栽培稻 TNG67 × 野生稻 *Oryza australiensis* (IRGC100882) 之雜種及回交植株。(a) F_1；(b) BC_1F_1；(c–i) BC_2F_1。

Fig. 2. The phenotypes of *Oryza sativa* (cv. TNG67) × *O. australiensis* (IRGC100882) cross combination. (a) F_1; (b) BC_1F_1; (c–i) BC_2F_1.

更多之 F_2 種子，或回交獲得 BC_3F_1、BC_4F_1，並同時繁殖 BC_2F_2、BC_3F_2、BC_3F_1、BC_4F_1 各多次回交族群以探討稔實率及各項農藝性狀之表現。其中稔實率的高低常做為判斷兩雜交組合親和性的標準，也是遠緣雜交育種過程中選拔的重要依據，圖 3 顯示各族群的平均稔實率均低於輪迴親本，於 BC_2F_2、BC_3F_1 變異最大，有多數植株稔實率低於 50%，也有少數稔實率低於 5%的自交不稔株出現。於 BC_3F_2、BC_4F_1 分別明顯集中於輪迴親附近，但於 BC_3F_2 仍有少數植株低於 50%，BC_4F_1 族群分布較為集中介於 60–90%之間。說明栽培稻與 EE 染色體組野生稻的雜交組合，於 BC_2F_2 已可獲得正常可稔植株。

在其他產量構成要素中，各世代平均每株穗數均低於輪迴親本 TNG67 (13.7 穗) (圖 3)，且各族群中均有低於 5 穗的植株。各族群中以 BC_2F_2 的變異最高，最少只有 2 穗最多可達 46 穗。BC_3F_2、BC_4F_1 大多數植株介於 5–15 穗之間，平均分別為 10.5、9.8 穗，結果也顯示各族群於第 3、4 次回交族群中，已可找到完全恢復輪迴親穗數的特性。

在每穗粒數方面，各世代每穗平均粒數均多於輪迴親本 (105 粒) (圖 3)，而於 BC_2F_2 及 BC_3F_1 仍有異常或弱勢植株因此變異均高，兩族群中每穗粒數平均最少分別為 2.3 粒、1.5 粒，最高分別為 182.2 粒、178.8 粒，BC_3F_2、BC_4F_1 大多數植株介於 85–135 粒之間，明顯看出有多數植株具有超越輪迴親之表現。

在千粒重的表現 (圖 3)，各族群都有較輪迴親 TNG67 (25.6 g) 重的植株出現，變異性以 BC_3F_1 變異較高且變域最大由 12.6–28.6 g，平均 24.3 g，各族群分布的高峰均在 23–25 g 之間，以 BC_3F_2 最重，平均千粒重為 25.2 g。

在影響穗型態的穗長上 (圖 4)，各族群的平均穗長均大於輪迴親本 TNG67，以 BC_3F_1 最長為 19.1 cm，變異也最大，由 11.7–23 cm，BC_2F_2 族群分布在 13.9–21.7 cm 之間， BC_3F_2、BC_4F_1 大都數植株介於 17–19 cm 之間。在著粒密度方面 (圖 4)，以 BC_2F_2 的變異最大介於 0.1–11.1 粒，族群平均與輪迴親本相同均為 5.9 粒；BC_3F_2、BC_4F_1 大都數植株介於 5.5–9.5 cm 之間，平均多於輪迴親本。在穗重的表現 (圖 4)，於各世代均有穗重少於 1.5 g 的植株，以 BC_2F_2 及 BC_3F_1 族群的比例較高，且變異較大，兩族群平均穗重都低於輪迴親本，於 BC_3F_2、

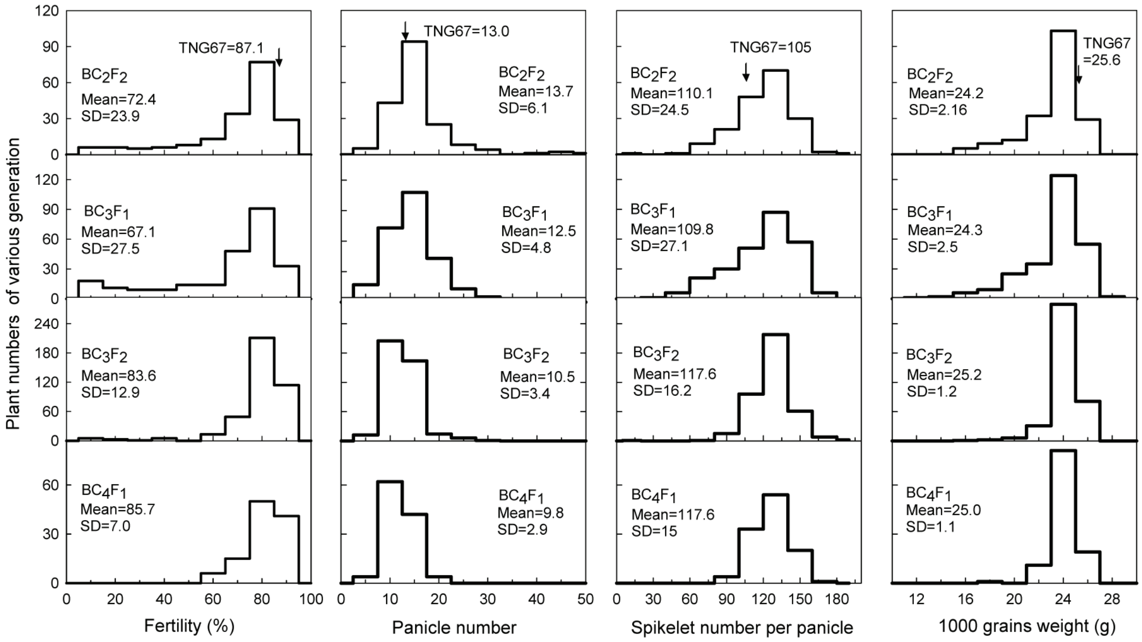


圖 3. 栽培稻 TNG67 × 野生稻 *O. australiensis* (IRGC100882) 雜交及回交各 F_1 及 F_2 族群稔實率、穗數、每穗粒數及千粒重之頻度分佈。

Fig. 3. Frequency distribution of fertility, panicle number, spikelet numbers per panicle, and 1000 grains weight for the population of various backcross generations from *Oryza sativa* (cv. TNG67) × *O. australiensis* (IRGC100882), which the TNG67 is recurrent parent. SD: Standard deviation. Arrows indicate the means of TNG67.

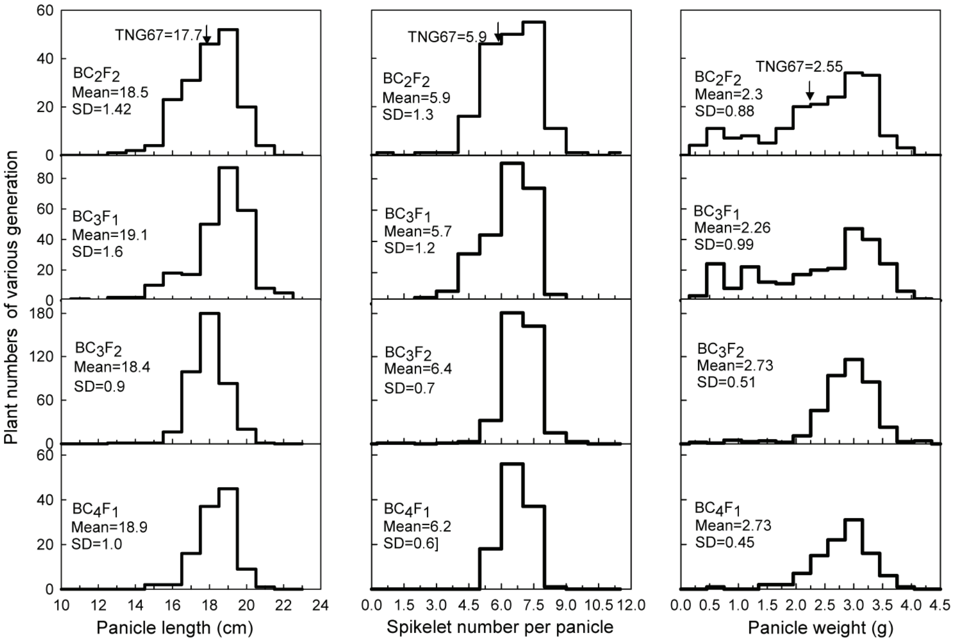


圖 4. 栽培稻 TNG67 × 野生稻 *O. australiensis* (IRGC100882) 雜交及回交各 F_1 及 F_2 族群穗長、穗著粒密度及穗重之頻度分佈。

Fig. 4. Frequency distribution of panicle length, spikelet numbers per cm panicle, and panicle weight for the population of various backcross generations from *Oryza sativa* (cv. TNG67) × *O. australiensis* (IRGC100882), which the TNG67 is recurrent parent. SD: Standard deviation. Arrows indicate the means of TNG67.

BC_4F_1 族群的平均穗重均超越輪迴親本。可看出各族群中在穗型的表現，有多數植株偏向野生稻穗長的特性，也有穗重型及著粒密度高密穗型重組合植株。

綜合以上各回交族群性狀之表現，因用於建構 BC_2F_2 族群之 BC_2F_1 植株需正常且具稔性之植株，異常不稔植株，無法獲得種子進行繁殖評估，但 BC_2F_1 的異常 (不稔) 植株經回交卻可獲得種子用以建構 BC_3F_1 族群，也因此各回交族群變異性表現，往往 BC_3F_1 有高於 BC_2F_2 之趨勢。另外於 BC_2F_2 及 BC_3F_1 族群中雖然都有少數弱勢植株影響族群的分布，但超親分離的植株也於這兩世代中最為明顯，如分蘖數、株高、穗長及每穗粒數等。就各族群的平均而言，於稔實率、每株穗數及千粒重均低於輪迴親 TNG67，但每穗粒數及穗長則都大於輪迴親 TNG67，顯示 TNG67 × IRGC100882 的組合中，野生稻穗長的特性配合輪迴親高產特性可以組合出每穗粒數較輪迴親更多的植株。

回交後裔高級世代產量評估

栽培稻 TNG67 × *O. australiensis* (IRGC 100882) 經回交 3 次之 BC_3F_1，經 3 年 6 個期作的外表型評估，於 BC_3F_7 選出 111 個系統進行產量及產量有關性狀之評估，所得結果如圖 5 所示，各系統經由外表型的選拔其產量仍表現出極大的差異，介於 3528–6558 kg/ha 之間，平均 5006 kg/ha；大多數系統產量低於輪迴親本 TNG67 (5334 kg/ha)，但有 8 個 (7%) 系統比 TNG67 增加 10%以上，最高增產達 23%。

在產量構成要素中，各系統的每株穗數介於7–20穗，平均12.4穗，少於輪迴親；每穗粒數平均為104粒，各系統分布在67.8–174.1粒，最高比輪迴親增加 78.4%；在稔實率方面，TNG67為74.3%，而種間雜交各系統的分布介於52–91.4% 之間，最高比輪迴親增加23.1%，平均 72.2%，有超過半數系統稔實率高於輪迴親本，也有少數系統 (12 個) 稔實率仍低於60%；各系統千粒重的分布在 17.5–28.8 g 之間，大多數系統介於22–25 g，有半數以上的系統千粒重明顯低於輪迴親 TNG67 (24.9 g)，最高比輪迴親增加 15.7%。由以上結果可知，來自回交族群中的產量性狀表現如穗數少、每穗粒數多、稔實率低或超越親本的特性，已被固定於這些高級世代的系統中。

由前述可知回交後裔之 F_1、F_2 中有大穗及著粒密的穗型出現，由圖6中可以明顯看出，穗型的特性也出現在這些高級系統中，其穗重及穗長上均有多數系統超越輪迴親本的表現(圖5)，各系統的穗重分布在1.26–2.74 g之間，有半數系統介於2–2.2 g之間，最佳的系統較輪迴親增加 38.4%；穗長的分布在 15.4–23.2 cm之間，平均19.1 cm，大於輪迴親本 (18.4 cm)，增加幅度最多達 26.2%，說明部分系統已具有野生稻 *O. australiensis* 穗長的特性。就穗的著粒密度而言，各系統每公分穗的平均著粒數分布在 3.71–8.09 粒之間，多數的系統介於 5–6粒之間，有多數系統多於輪迴親本的5.27粒，顯示種間雜交於回交族群中所重組合出的特殊性狀也被固定下來。

綜合這些高級世代各系統的表現，就各系統產量與各性狀相關性而言 (表 4)，產量與各性狀的相關性均低；在產量的構成要素中的每穗粒數與穗長、穗重及著粒密度呈極顯著正相關；在穗型態上，顯然由野生稻而來的穗長特性對產量並無直接的貢獻，雖然穗長增加每穗粒數有增加的趨勢，卻也因稔實率降低而使得產量受到限制。

討　　論

種間雜交通常存在著受精前與受精後的繁殖障礙。Sitch (1990) 綜論以往稻屬種間雜交的結果，栽培稻與染色體組 BB、BBCC、CC、CCDD、EE、FF的野生稻種間雜交之稔實率為0–30.0%。其中栽培稻與 *O. australiensis* (EE)的雜交所得的可稔率均未達1% (Li *et al*. 1963; Multani *et al*. 1994)，一般也認為雜交可稔率在栽培稻或野生稻種及同種內系統的差異存有極大的變異，如不同栽培稻與同一野生稻種雜交，有些雜交組合可得到雜交種子，但有些則無法得到 (Sitch *et al.* 1989; Naredo *et al*. 1997)。本試驗以 5 個栽培品種與具 EE 染色體組野生稻 *O. australiensis* 3個系統雜交，所得雜交可稔率從 0.8–54.6%，也顯示出因不同品種與同一野生稻系統雜交或同一品種與不同野生稻系統雜交均有所差異。

雖然有些報告指出，栽培稻與與非 AA 染色體組野生稻種雜交，授粉後常有胚或乳退化的現象，例如栽培稻與野生稻種 *O. offficinalis* 雜交 F_1 種子於授粉後 8–10 日除胚發育成形外，胚乳完全退化 (Chang 1978)。然而 Jena & Khush (1984) 也發現栽培稻與野生稻 *O. officinalis* 及 *O. australiensis* 其雜種 F_1 種子於授粉後二週胚乳退化，利用未熟胚培養成功率在80%左右的結果。本試驗的胚拯救培養成功率部分組合雖有明顯偏低之現象，但仍然可獲得其後代。然而試驗中透過胚拯救培養得到的雜種植株，由於染色體的配對異常，雜種植株完全不稔。Ho & Li (1966) 研究指出栽培稻與 *O. australiensis* 的雜種 F_1 的花粉稔性僅2.02%，而回交 2000 個穎花也僅得到 2 粒，可稔率為0.1%。而 Multani *et al*. (1994) 發現即使回交20,234穎花也均無法穫得具活力之種子。本試驗中 TNG67 × *O. australiensis* (IRGC100882)

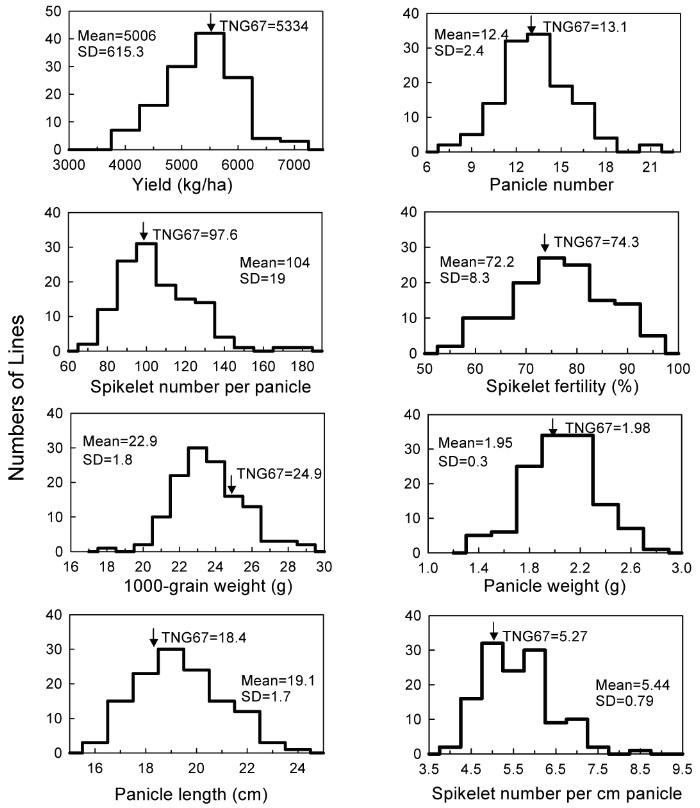


圖 5. 栽培稻 TNG67 × 野生稻 *O. australiensis* (IRGC100882) 之 BC_3F_7 產量及各項農藝性狀頻度分布。

Fig. 5. Frequency distribution of yield and agronomic characteristics in BC_3F_7 progenies from *Oryza sativa* (cv. TNG67) × *O. australiensis* (IRGC100882) backcross population. SD: Standard deviation; Arrows show the means of TNG67.

圖 6. 栽培稻 TNG67 × 野生稻 *O. australiensis* (IRGC100882) 導入系統穗型之變異。

Fig. 6. Different panicle types in the introgression lines from *Oryza sativa* (cv. TNG67) × *O. australiensis* (IRGC 100882) cross combination.

表 4. 台農 67 號與野生稻 *O. australiensis* (IRGC100882) 導入系統間的外表型相關

Table 4. The phenotypic correlations of introgression lines from *O. australiensis*

Character [z]	Yd	PN	PG	FER	GW	PW	PL
PN	0.17						
PG	0.01	-0.29**					
FER	0.32**	-0.10	-0.43**				
GW	0.27**	-0.02	-0.38**	0.26**			
PW	0.29**	-0.40**	0.71**	0.19*	0.18		
PL	-0.16	-0.16	0.57**	-0.48**	-0.18	0.34**	
PD	0.11	-0.27**	0.86**	-0.21*	-0.34	0.66**	0.07

**, * denote significance at 1% and 5% level, respectively.

[z] Yd: Yield; PN: panicle number; PG: spikelet numbers per panicle; FER: spikelet fertility; GW: 1000-grain weight; PW: panicle weight; PL: panicle length; PD: spikelet numbers per cm panicle.

雜種 F_1 授以輪迴親花粉，因花粉粒不發芽或花粉管伸長受阻，因此回交的成功率很低 (< 0.89%)，但於 BC_2F_1 已可獲得部分可稔植株，經第三次回交，可稔率恢復可達 45.95%。顯示栽培稻與 *O. australiensis* 野生稻雜交，除雜交時兩親本的親和性外，導入野生稻有用性狀的最大限制來自於雜種植株的繁殖 (回交) 障礙。

在以往的育種經驗中認為野生稻具有容易落粒、易倒伏、品質及產量差等不良性狀，因此在育種利用上主要針對野生稻特有的抗病、抗蟲特性之導入，在數量性狀如產量、品質的研究則相對減少。進行種間雜交除兩親間之親和性障礙、雜種 F_1 弱勢及 F_2 族群建立不易外，也常因均質性不高、F_2 的不稔與不良性狀強烈連鎖，即使獲得標誌的材料卻未能有效被利用。雖然與栽培稻親緣較近的野生稻種 *O. rufipogon* 在數量性狀的研究與利用上頗多，但野生稻 *O. australiensis* 被歸類為第二級基因庫，受限於雜交親和性及其選拔族群的建立，育種利用上主要針對其抗病及抗蟲等特性的導入 (Multani *et al*. 1994; Ishii *et al*. 1994)，尚未針對栽培稻與 *O. australiensis* 育成的導入系統在數量性狀之表現進行廣泛討論。本試驗經由多次回交，於 BC_2F_2 及 BC_3F_1 各性狀均有較高的變異性，且在回交初級 ($BCnF_1$、$BCnF_2$) 世代產量及各性狀均有超越輪迴親的系統出現，認為於 BC_2F_2 及 BC_3F_1 進行選拔的有效性。Fujimaki (1978) 也認為回交過程中針對輪迴親本具有的有利基因選拔，在回交族群初期世代以變異大選拔較具效果。Tan *et al*. (2007) 於建立 *O. rufipogon* 的 ILs 過程中也認為配合分子標誌及外表型選拔於 BC_3 可以建立涵蓋野生稻整套基因組的 ILs。針對本試驗中回交高級系統的產量及其相關性狀的評估，有 7%的系統較輪迴親增產 10%以上，也發現重組合中有新的性狀出現，如穗長有長於輪迴親偏向野生稻的系統或異於兩親的密穗系統。本試驗於成立的高級系統中發現增加穗長及每穗穎花數，因有效穗數及稔實率降低而對產量並無增進的效果。目前在野生稻 *O. rufipogon* 的 ILs 中獲得對產量具有增加效應的相關性狀中，主要來自每穗有效粒數、單株產量及穗數等性狀 (Xiao *et al*. 1996, 1998; Tian *et al*. 2006; Tan *et al*. 2007)，顯示由野生稻 *O. australiensis* 而來的 ILs 其增產的效應有別於由 *O. rufipogon* 所獲得的效應，值得進一步加以探討。另外，在建立的系統中有多數的株高偏高，分蘗變少，可確定野生稻 *O. australiensis* 的性狀被導入栽培稻中，但經多次回交及多次自交後代仍表現出偏

向野生稻的現象，意味著這些野生稻的性狀具有強烈的連鎖作用，或帶有較多的野生稻基因所致，而許多學者認為帶有野生稻基因越多的 ILs 產量超越輪迴親的優勢越低；反之，則有越高的表現 (Tian *et al*. 2006; Rangel *et al*. 2008)。也有學者認為種間雜交後代 ILs 中不僅是染色體片段的置換，包含著基因的重組或是基因的交感作用 (上位性作用) (Ishii *et al*.1994; Tian *et al*. 2006; Tan *et al*. 2007)，則可用來解釋試驗中高產系統的表現或是異於兩親密穗型的表現。多數學者指出育成的 ILs 可以進一步的建立 QTL-NIL (QTL-near isogenies line) 或第二次 F_2 族群，針對目標性狀進行更詳盡的分析 (Tanksley & Nelson 1996; Tian *et al*. 2006; Tan *et al*. 2007)。Rangel *et al*. (2008) 則直接從栽培稻與野生稻 *O. glumaepatula* (AA 染色體組) 所建立的 ILs 中選出優質高產品系進行命名及推廣，而本試驗中由 *O. australiensis* 而來的導入系統或許未來也有可能選出優良系統，則有待進一步的試驗。

引用文獻 (Literature cited)

Amante-Bordeos A., L. A. Sitch, R. Nelson, R. D. Dalmacio, N. P. Oliva, H. Aswidinnoor, and H. Leung. 1992. Transfer of bacterial blight and blast resistance from the tetraploid wild rice *Oryza minuta* to cultivated rice, *Oryza sativa.* Theor. Appl. Genet. 84:345–354.

Brar, D. S. 2005. Broadening the gene pool of rice through introgression from wild species. p.157–159. *in*: Rice is Life: Scientific Perspectives for the 21st Century. (Toriyama, K., K. L. Heong, and B. Hardy, eds) Los Baños (Philippines): International Rice Research Institute, and Tsukuba (Japan): Japan International Research Center for Agricultural Sciences.

Chang, T. M. 1978. Studies on embryo and endosperm development following interspecific cross in rice. J. Agric. Res. China 27:259–266. (in Chinese with English abstract)

Chen, Y. J. and H. K. Wu. 1982. A comparison of karyotypes among six *Oryza* species. Bot. Bull. Acad. Sinica 23:163–183. (in Chinese with English abstract)

Fu, X. L., Y. G. Lu, X. D. Liu, and J. Q. Li. 2009. Crossability barriers in the interspecific hybridization between *Oryza sativa* and *O. meyeriana*. J. Integrat. Plant Biol. 51:21–28.

Fujimaki, H. 1978. Genetical studies on improvement of backcross technique in rice breeding. J. Cent. Agric. Exp. Stn. 27:187–246.

Harlan, J. R. and J. M. J. de Wet. 1971. Toward a rational classification of cultivated plants. Taxon 20: 509–517.

Hirabayashi, H., E. R. Angeles, R. Kaji, T. Ogawa, D. S. Brar, and G. S. Khush. 1998. Identification of brown planthopper resistance gene derived from *O. officinalis* using molecular markers in rice. Breed. Sci. Suppl. 48:82. (in Japanese with English abstract)

Hirabayashi H., R. Kaji, E. R. Angeles, T. Ogawa, D. S. Brar, and G. S. Khush. 1999. RFLP analysis of a new gene for resistance to brown planthopper derived from *O. officinalis* on rice chromosome 4. Breed. Sci. Suppl. 49:48. (in Japanese with English abstract)

Huang, Z., G. He, L. Shu, X. Li, and Q. Zhang. 2001. Identification and mapping of two brown planthopper resistance genes in rice. Theor. Appl. Genet. 102:929–934.

Huang, C. S., R. H. Buu, C. C. Chen, and C. H. Cheng. 1985. Development of rice variety Tainung 69. J. Agric. Res. China 34:125–134. (in Chinese with English abstract)

Ho, K. C. and H. W. Li. 1966. Cytogenetical studies of *Oryza sativa* L. and its related species. 10. Study on meiosis and unreduced gametes formation of the hybrid *O. sativa* L. × *O. australiensis* Domin. Bot. Bull. Acad. Sin. 7:13–35。

Ishii, T., D. S. Brar, D. S. Multani, and G. S. Khush. 1994. Molecular tagging of genes for brown planthopper resistance and earliness introgressed from *Oryza australiensis* into cultivated rice, *O. sativa.* Genome 37:217–221.

Jena, K. K. and G. S. Kush. 1984. Embryo rescue of interspecific and its scope in rice improvement. Rice Genet. Newsl. 1:133–134.

Jena, K. K. and G. S. Khush. 1989. Monosomic alien addition lines of rice: production, morphology, cytology, and breeding behavior. Genome 32: 449–455.

Jena K. K., J. U. Jeung, J. H. Lee, H. C. Choi, and D. S. Brar. 2006. High-resolution mapping of a new brown planthopper (BPH) resistance gene, *Bph18(t)*, and marker-assisted selection for BPH resistance in rice (*Oryza sativa* L.) Theor. Appl. Genet. 112:1192–1194.

Jena K. K. and G. S. Khush. 1990. Introgression of genes from *Oryza officinalis* Well ex Watt to cultivated rice, *O. sativa* L. Theor. Appl. Genet. 80:737–745.

Jin. H., G. Tan, D. S. Brar. M Tang, G. Li, L. Zhu, and G. He. 2006. Molecular and cytogenetic characterization of an *Oryza officinalis-O. Sativa* chromosome 4 addition line and its progenies. Plant Mol. Biol. 62:769–777.

Kobayashi, N., R. Ikeda, G. S. Kush, and D. S. Brar. 1992. Resistance to rice tungro spherical virus in monosomic alien addition lines (MAALs) of *Oryza officinalis*. Rice Genet. Newsl. 9:37–38.

Khush G. S. 1997. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice. Plant Mol. Biol. 35:25–34.

Khush, G. S., E. Bacalangco, and T. Ogawa. 1990. A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. Rice Genet. Newsl. 7:121–122.

Kush, G. S. and K. C. Ling. 1974. Inheritance of resistance to grassy stunt virus and its vector in rice. J. Hered. 65:134–136.

Li, C. P., Y. H. Chen, C. G. Chern, T. H. Tseng, C. C. Chen, M. S. Lai, and Y. C. Kou. 1994. Broadening genetic diversity of cultivated rice through interspecific hybridization within Genus *Oryzeae* I. Evaluation of agronomic characteristics of introduced wild rice species. J. Agric. Res. China. 43:261–274. (in Chinese with English abstract)

Li, G., W. Hu, R. Qin, H. Jin, G. Tan, L. Zhu, and G. He. 2008. Simple sequence repeat analysis of interspecific hybrids and MAALs of *Oryza officinalis* and *Oryza sativa*. Genetica 134:169–180.

Li, H. W., C. C. Chen, T. S. Weng, and K. D. Wu. 1963. Cytogenetical studies of *Oryza sativa* L. and its related species 4. Interspecific crosses involving *O. australiensis* with *O. sativa* and *O. minuta.* Bot. Bull. Acad. 4:65–74.

Lin, S. C. and L. P. Yuan. 1980. Hybrid rice breeding in China. p.35–51. *in*: Innovative Approaches to Rice Breeding Manila (Philippines). International Rice Research Institute (IRRI) Los Baños, Philippines.

Lo, S. F., Y. S. Chen, C. C. Li, and H. S. Tsay. 1997. *In vitro* culture of immature F1 embryos of *Oryza sativa* × *O. officinalis.* J. Agric. Res. China 46: 207–215. (in Chinese with English abstract)

Mariam, A., A. H. Zakri, M. C. Mahani, and M. N. Normah. 1996. Interspecific hybridization of cultivated rice, *Oryza sativa* L. with the wild rice, *O. minuta*. Theor. Appl. Genet. 93:664–671.

Masumoto C., T. Ishii, S. Kataoka, T. Hatanaka, and N. Uchida. 2004. Enhancement of rice leaf photosynthesis by crossing between cultivated rice, *Oryza sativa* and *O. rufipogon*. Plant Prod. Sci. 7:252–259.

Moncada P., C. P. Martinez, J. Borrero, M. Chatel, J. H. Gauch, E. Guimaraes, J. Tohme, and S. R. McCouch. 2001. Quantitative trait loci for yield and yield component s in an *Oryza sativa* × *Oryza rufipogon* BC_2F_2 population evaluated in an upland environment. Theor. Appl. Genet. 102: 41–52.

Multani, D. S, K. K. Jena, D. S. Brar, B. C. delos Reyes, E. R. Angeles, and G. S. Khush. 1994. Development of monosomic alien addition lines and introgression of genes from *Oryza australiensis* Domin. to cultivated rice *O. sativa* L. Theor. Appl. Genet. 88:102–109.

Naredo, Ma. E. B., A. B. Juliano, B. R. Lu, and M. T. Jackson. 1997. Hybridization of AA genome rice species from Asia and Australia. I. Crosses and development of hybrids. Genet. Resour. Crop Evol. 44:17–23.

Ohmido N., K. Fukui, and T. Kinoshita. 2005. Advances in rice chromosomes research. Proc. Jpn. Acad. 81:382–392.

Piegu, B., R. Guyot, N. Picault, A. Roulin, A. Saniyal, H. Kim, K. Collura, D. S. Brar, S. Jackson, R. A. Wing, and O. Panaud. 2006. Doubling genome size without polyploidization: Dynamics of retrotransposition-driven genomic expansions in *Oryza australiensis*, a wild relative of rice. Genome Res. 16:1262–1269.

Rangel, P. N., R. P. V. Brondani, P. H. N. Rangel, and C. Brondani. 2008. Agronomic and molecular characterization of introgression lines from the interspecific cross *Oryza sativa* (BG90-2) × *Oryza glumaepatula* (RS-16). Genet. Mol. Res. 7: 184–195.

Renganayaki, K., A. K. Fritz, S. Sadasivam, S. Pammi, S. E. Harington, S. R. McCouch, S. M. Kumar, and A. S. Reddy. 2002. Mapping and progress toward

map-based cloning of brown planthopper biotype-4 resistance gene introgressed from *Oryza officinalis* into cultivated rice *O. sativa.* Crop Sci. 42:2112–2117.

Sitch, L. A., R. D. Dalmacio, and G. O. Romero. 1989. Crossability of wild *Oryza* species and their potential use for improvement of cultivated rice. Rice Genet. Newsl. 6:58–60.

Sitch, L. A. 1990. Incompatibility barriers operating in crosses of *Oryza sativa* with related species and genera. p.77–94. *in*: Genetic Manipulation in Plant Improvement II. (Gustafson, J. P., ed.) Plenum Press. New York.

Suputtitada, S., T. Adachi, P. Pontongkam, S. Peyachoknagul, S. Apisitwanich, and J. Thongpradistha. 2000. Breeding barriers in the interspecific cross of *Oryza sativa* L. and *Oryza minuta* Presl. Breed. Sci. 50:29–35.

Tan, L., F. Liu, W. Xue, G. Wang, S. Ye, Z. Zhu, Y. Fu, X. Wang, and C. Sun. 2007. Development of *Oryza rufipogon* and *O. sativa* introgression lines and assessment for yield-related quantitative trait loci. J. Integrat. Plant Biol. 49:871−884.

Tanksley, S. D. and J. C. Nelson. 1996. Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTL from unadapted germplasm into elite breeding lines. Theor. Appl. Genet. 92:191–203.

Tanksley, S. D., S. Grandillo, T. M. Fulton, D. Zamir, Y. Petiard, J. Lopez, and T. Beck-unn. 1996. Advanced backcross QTL analysis in a cross between an elite processing line of tomato and its wild relative *L. pimpinellifolium.* Theor. Appl. Genet. 92:213–224.

Tian F., D. J. Li, Q. Fu, Z. F. Zhu, Y. C. Fu, X. K. Wang, and C. Q. Sun. 2006. Construction of introgression lines carrying wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) segments in cultivated rice (*Oryza sativa* L.) background and characterization of introgressed segments associated with yield-related traits. Theor. Appl. Genet. 112:570–580.

Xiao, J., S. Grandillo, S. N. Ahn, S. R. McCouch, S. D. Tanksley, J. Li, and L. Yuan. 1996. Genes from wild rice improve yield. Nature 384:223–224.

Xiao J, J. Li, S. Grandillo, A. Sang-Nag, L. Yuan, S. D. Tanksley, and S. R. McCouch. 1998. Identification of trait-improving quantitative trait loci alleles from a wild rice relative, *Oryza rufipogon*. Genetics 150:899–909.

Yang, H., X. Ren, Q. Weng, L. Zhu, and G. He. 2002. Detection and analysis of QTL for resistance to brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal), in rice (*Oryza sativa* L.), using backcross inbred lines. Hereditas 136:39–43.

Yasui, H., K. I. Nonomura, and N. Iwata. 1995. Identification of *Oryza punctata* chromosomes transferred to monosomic alien addition lines of *O. sativa* fluorescence *in situ* hybridization. Rice Genet. Newsl. 11:76–77.

Yasui, H. and N. Iwata. 1991. Production of monosomic alien addition lines of *Oryza sativa* having a single *O. punctata* chromosome. Rice Genet. Newsl. 2:147–155.

Ye, Z. H. and R. C. Saxena. 1990. Resistance to white-backed planthopper in elite lines of cultivated × wild rice crosses. Crop Sci. 30:1178–1182.

Construction of Introgression Lines from Wild Rice (*Oryza australiensis* Domin) and Assessment of Yield-Related Traits [1]

Charng-Pei Li[2,5], Hsin-Mei Ku[3], Tzer-Kuan Hu[3], Chyr-Guan Chern[4], Ming-Hsing Lai[4], Ching-Shan Tseng[4], Jen-Ren Chen[2], and Tung-Hi Tseng[2]

Abstract

Li, C. H., H. M. Ku, T. K. Hu, C. G. Chern, M. H. Lai, C. S. Tseng, J. R. Chen, and T. H. Tseng. 2009. Construction of introgression lines from wild rice (*Oryza australiensis* Domin) and assessment of yield-related traits. J. Taiwan Agric. Res. 58:219–233.

To develop introgression lines (ILs) from wild rice, five Japonica varieties cultivated rice (*Oryza sativa*) were crossed with three accessions of wild rice *O. australiensis,* obtained from International Rice Research Institute (IRRI). The percentage of seed set and germination in embryo rescue culture varied with crosses, ranging from 2.3 to 54.6% for seed sets and 0 to 83.3% for seed germination. Among the three crosses, Tainung 67 (TNG67) × IRGC100882, TNG67 × IRGC101397, and TNG67 × IRGC101410, F_1 weakness was observed in TNG67 × IRGC101410, whereas all of the three crosses failed to produce F_2 seeds. Backcross was successful only for the hybrid TNG67 × IRGC100882, using TNG67 as the recipient, and the production of seeds from this hybrid was low (< 0.98%) in the first and second generations of backcross but raised to 46% in the third generation of backcross. To evaluate yield-related traits in multiple generations backcross populations, wide ranges of variations in BC_2F_2 and BC_3F_1 were observed, suggesting that they are the best generations for selection in the breeding procedure. To assess yield-related traits, 111 lines BC_3F_7 were selected from BC_3F_1. Eight lines were showed more than 10% higher grain yield than TNG67. The others trait-enhancing lines best over TNG67 were from 15.7% in 1000-grains weight to 78% in panicle length. These ILs will be useful as a source of valuable traits for the rice improvement and for detecting favorable genes of wild rice *O. australiensis*.

Key words: *Oryza sativa*, *Oryza australiensis*, Interspecific hybridization, Backcross, Embryo rescue culture, Introgression lines, Yield related traits.

---

1. Contribution No.2369 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: September 15, 2009.
2. Respectively, Assistant Researcher, Assistant Researcher, Assistant Researcher, and Associate Researcher, Biotechnology Division, TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
3. Respectively, Assistant Professor and Professor, Department of Agronomy, National Chung-Hsing University, Taichung, Taiwan, ROC.
4. Associate Researcher, Crop Science Division TARI, Wufeng, Taichung, Taiwan, ROC.
5. Corresponder author, e-mail: charngpei@tari.gov.tw; Fax: (04)23302806.

台灣農業研究 (J. Taiwan Agric. Res.) 58(3):234–242(2009)

ABA、Fluridone 及 Sucrose 對鐵炮型及群間雜交種百合鱗片葉發育形態影響之研究[1]

戴廷恩[1,4] 許圳塗[2]

摘 要

戴廷恩、許圳塗。2009。ABA、Fluridone 及 Sucrose 對鐵炮型及群間雜交種百合鱗片葉發育形態影響之研究。台灣農業研究 58:234–242。

為研究 ABA 對於百合鱗片葉發育形態之影響，以台灣百合 (F)、鐵炮百合 (L)、東方型百合栽培種‘Casa Blanca’ (CA) 及群間雜交種 F × CA 及 L × CA 為材料，利用 ABA、Fluridone 及糖於試管內進行研究。外加 ABA 及 Fluridone 培養 4 週及 8 週，鱗片葉生長調查結果顯示鱗片葉生長均明顯受到 ABA 的抑制及 Fluridone 的促進，ABA 會抵銷 Fluridone 的效應。ABA 濃度變化結果顯示 CA 有最高內生 ABA 濃度，F 及 L 最低，雜交種則介於兩親本間，外加 ABA 促使鱗片 ABA 濃度增加，Fluridone 處理使鱗片 ABA 內含量濃度減少。糖對鱗片葉形態發育的調查數據顯示高濃度糖抑制鱗片葉的發生，但抑制效果不如外加 ABA，依然有一定程度的鱗片葉發生。

關鍵詞：百合、離層酸、離層酸合成抑制劑、蔗糖、鱗片葉。

前 言

一般植物的葉片大多為扁平狀，多數葉片可以區分為三個部分，托葉 (stipule)、葉柄 (petiole or rachis) 及葉身 (blade or lamina)，有些葉片並無法清楚區分出這三個部分，不同植物會有不同變形，甚至於同一株植物葉片也會出現多樣性的變化 (Poethig 1997)。百合的鱗片就是變形葉的一種，由葉基部肥大而成 (Kim *et al.* 1994)，兼具營養儲藏及繁殖的功能。百合由實生苗或不定芽之莖頂分生組織 (apical meristem) 分化出葉原體，可生長分化為莖生葉或變形生長為鱗片 (Jin 1995)。鱗片發育同樣具有形態發育可塑性，可發育為鱗片 (scale)、劍形鱗片葉 (sword scale leaf) 及鱗片葉 (scale leaf)。具有異形葉的水生植物，相關研究指出 ABA 與葉片形態有一定程度的關係，可以誘導沉水枝產挺水葉 (Goliber & Feldman 1989; Smith & Hake 1992)。百合培養基加入 ABA，再生株變成只有鱗片之形成，完全沒有鱗片葉之形成 (Kim *et al.* 1994)。百合鱗片葉的形成受到 ABA 的抑制 (Wu 2001; Chen 2003; Gerrits *et al.* 1992)，ABA 內含量高易造成無葉身鱗片發生 (Wu 2001; Chen 2003)。葉片生長由遺傳所

1. 行政院農業委員會農業試驗所研究報告第 2368 號。接受日期：98 年 9 月 9 日。
2. 本所花卉研究中心副研究員兼系主任。台灣 雲林縣。
3. 國立台灣大學園藝系教授。台灣 台北市。
4. 通訊作者，電子郵件：tedai@tari.gov.tw；傳真機：(05)5820834。

決定的葉型變異存在於許多屬或種植物，可以藉由雜交，觀察後代變化，了解葉型變異上之遺傳關係或行為 (McLellan 1990)。因為 ABA 對百合鱗片葉形態發育影響的相關研究，缺乏不同基因型間 ABA 濃度變化與葉片形態發育之關係，本研究以鐵炮型百合、東方型百合及其相關群間雜交種，定量濃度變化，以研究 ABA 與百合鱗片葉形態發育間之關係。

參試 5 個百合品種，包括台灣百合 (*L. formosanum*，以下簡稱 F)、鐵炮百合 (*L. longiflorum*，以下簡稱 L)，東方型百合 (Casa Blanca，以下簡稱 CA)，群間 L/O 雜交種 *L. formosanum* × Casa Blanca (F × CA) 及 *L. longiflorum* × Casa Blanca (L × CA)。以組織培養鱗片繁殖，選取已發育具有 2 至 3 片葉 (除 CA 外) 之植株，移植培養於直型瓶 (高約 10 cm、直徑約 3 cm)，MS 培養基為對照組，MS 培養基分別添加 ABA 1 mg/L、Fluridone 0.1 mg/L (Fluka, Riedel-de Haën, Germany)、ABA 1 mg/L + Fluridone 0.1 mg/L、sucrose 120 g/L 及 sucrose 120 g/L + Fluridone 0.1 mg/L 為處理組。培養基定量每瓶 20 mL，25℃ ± 2℃，光照 16 小時，每瓶 1 株為 1 重複，共 6 重複。培養時間 4 及 8 週，每隔 1 週紀錄鱗片葉數，每隔 4 週，逢機取樣 5 株測定鱗片 ABA 含量。ABA 之定量方法主要參考 Chen *et al*. (2001) 及 Walker-Simmons (1987)，材料秤重後，加入 1 mL 之萃取液 (80% MeOH with 2% glacial acetic acid)，研磨後於 4℃黑暗下靜置 24 小時以上。5000 rpm (1500 g) 離心 10 分鐘，取上清液以離心真空濃縮機 (centrifugal evaporator, EYELA CVE-3100) 抽乾，加入 0.5 mL 100% MeOH 及 0.5 mL 0.2 M $NH_4H_2PO_4$ (pH 6.8)，於 4℃下，靜置 10 分鐘，再以 polyvinylpyrrolidone (PVP) 管柱過濾，加入 6 mL 雙重蒸餾水沖洗管柱，收集濾液。濾液加入 100 µL glacial acetic acid，緩慢通過 C_{18} 管柱 (C_{18} column, Sep-Pak Cartridges, Waters, USA)，再分別以 4 mL 含 2% glacial acetic acid 之 20% MeOH 及 4 mL 含 2% glacial acetic acid 之 55% MeOH 沖洗管柱收集濾液。取 1 mL 濾液利用 ABA 試劑組 (Phytodetek ABA Kit, agdia®, USA) 反應後，以酵素免疫分析儀 (ELISA reader, BioRad 550) 測定波長 405 nm 的吸光值。利用 SAS 軟體計算標準偏差，進行變方分析 (analysis of variance) 後，並以最小顯著差異測驗 (least significant difference test, LSD) 分析各項處理對百合鱗片葉型發育之差異性。

ABA 與 Fluridone 處理，對於百合小鱗莖鱗片葉生長之影響，結果如表 1，對照組培養 4 週後，F 及 L 鱗片葉數發生最多，平均鱗片葉數分別達約 4.33 及 4.00 片；CA 呈現慢速生長，平均鱗片葉數不到 1 片，只有 0.50 片；而 L/O 雜交種則呈現中間型表現，4 週內分別有 2 片及 0.83 片的鱗片葉生長。加入 ABA 1 mg/L 後，供試基因型鱗片葉生長均明顯受到抑制，呈現近乎停滯的狀態，其中以 F 及 L 受到抑制程度最大，L/O 雜交種以 F × CA 受到影響較大。與 ABA 反應相反，加入 Fluridone 0.1 mg/L 後，鱗片葉生長明顯受到促進，CA 及 L × CA 增加約 4 倍，其餘基因型增加幅度較小。ABA 與 Fluridone 同時加入培養基，結果顯示鱗片葉生長明顯受到抑制，發育葉數與單獨加入 ABA 處理相近。相同處理培養 8 週，鱗片葉生長變化趨勢大致相同 (表 1)，對照組中，快速生長習性的 F 及 L 已具有鱗片葉 9 片及 8 片，而慢速生長的 CA 大約只有 1.5 片鱗片葉，L/O 雜交種依然呈現中間型表現，F × CA 及 L × CA 分別具有 4.17 及 3.50 片鱗片葉。培養 8 週後，ABA 的抑制效果依然明顯，各基因型於 8 週內均無法生長出 1 片鱗片葉，與對照組處理相比較，鐵炮型百合成長鱗片葉數相差約 16 倍，L/O 雜交種則減少約 6–7 倍。Fluridone 處理在 CA 及 L/O 雜交種依然呈現明顯促進鱗片葉生

表 1. ABA 及 Fluridone 處理對台灣百合 (F)、鐵炮百合 (L)、東方型百合 (CA) 及群間雜交種 (F × CA、L × CA) 鱗片葉生長之影響 (處理後 4 週及 8 週)

Table 1. The effect of ABA and Fluridone on the scale leaves formation of *L. formosanum* (F), *L. longiflorum* (L), Casa Blanca (CA) and L/O (F × CA, L × CA) hybrid lilies at 4 and 8 weeks often treatment

Weeks	Treatment	Scale leaf no.^{z}				
		F	L	CA	F × CA	L × CA
4	CK (MS medium)	4.33 ± 0.33 a	4.00 ± 0.37 b	0.50 ± 0.34 b	2.00 ± 0.37 b	0.83 ± 0.11 b
	A (ABA 1 mg/L)	0.00 ± 0.00 c	0.17 ± 0.17 c	0.00 ± 0.00 c	0.33 ± 0.21 c	0.50 ± 0.22 b
	F (Fluridone 0.1 mg/L)	4.67 ± 0.49 a	5.50 ± 0.56 a	2.17 ± 0.31 a	3.67 ± 0.33 a	3.33 ± 0.49 a
	AF (A + F)	0.50 ± 0.22 b	0.50 ± 0.34 c	0.00 ± 0.00 c	0.83 ± 0.40 c	0.83 ± 0.31 b
8	CK (MS medium)	9.00 ± 0.26 b	8.00 ± 0.52 a	1.50 ± 0.50 b	4.17 ± 0.40 b	3.50 ± 0.34 b
	A (ABA 1 mg/L)	0.50 ± 0.22 c	0.50 ± 0.22 b	0.00 ± 0.00 c	0.67 ± 0.21 c	0.50 ± 0.21 c
	F (Fluridone 0.1 mg/L)	10.00 ± 0.45 a	9.00 ± 0.58 a	3.83 ± 0.31 a	6.83 ± 0.87 a	6.33 ± 0.49 a
	AF (A + F)	0.50 ± 0.22 c	1.50 ± 0.43 b	1.17 ± 0.31 b	1.08 ± 0.20 c	1.00 ± 0.22 c

^{z} Values are the mean ± SE of six replicates after 4 and 8 weeks culturing time. Means within columns for each post-treatment time followed by different letters are significantly different at 5% level by LSD test.

長的效應，生育葉片數增加約 2 倍，但同時再加入 ABA 處理，Fluridone 的促進效果被抵銷，鱗片葉數目又受到抑制而減少。大致上外加 ABA 及 Fluridone 的處理，培養 4 週及 8 週的結果均顯示供試基因型的鱗片葉生長均明顯受到 ABA 的抑制及 Fluridone 的促進，ABA 會抵銷 Fluridone 的效應，所有的處理，L/O 雜交種鱗片葉生長均呈現中間型表現。

分析定量鱗片 ABA 濃度，以了解外加 ABA 及 Fluridone 等處理，對於內生 ABA 濃度的影響，結果如圖 1 所示。對照組鱗片內生 ABA 濃度，CA 最高約 3 nmol/FW (g)，F 及 L 最低約 1.5 nmol/FW (g)，F × CA 及 L × CA 的 ABA 濃度則在兩親本間。外加 ABA 1 mg/L 培養 4 週，促使鱗片內生 ABA 濃度大幅增加，F 及 L 濃度超過 20 nmol/FW (g)，F × CA 濃度也增加爲約 15 nmol/FW (g)，而 CA 及 L × CA 濃度接近 10 nmol/FW (g)。培養 8 週後，F、L 及 CA 增加幅度降低，F × CA 及 L × CA 則仍然有 8 倍左右的增加幅度 (圖 1)。Fluridone 0.1 mg/L 處理，明顯抑制 ABA 合成使鱗片內生 ABA 濃度減少約 1/2 以上，但是 F × CA 則不降反昇，尤其是培養 8 週時，鱗片內生 ABA 濃度明顯高出對照組 (圖 1)。同時處理 ABA 及 Fluridone，外加 ABA 抑制 Fluridone 的效果，使鱗片內生 ABA 濃度明顯增加。比較各處理之效果，F 及 L 以單獨外加 ABA 處理時的鱗片內生 ABA 濃度最高，CA、F × CA 及 L × CA 則以同時處理 ABA 及 Fluridone 時有最高的鱗片內生 ABA 濃度 (圖 1)。由以上歸納結果，CA 有最高鱗片內生 ABA 濃度，F 及 L 最低，L/O 雜交種則介於兩親本間；外加 ABA 促使鱗片 ABA 濃度增加，Fluridone 處理使鱗片 ABA 濃度減少，同時外加 ABA 會抵銷 Fluridone 的作用，促使鱗片 ABA 內含量濃度增加。

培養基中加入高濃度 Sucrose (120 g/L) 造成滲透壓逆境，由葉片生長觀察及 Fluridone，的加入，比較高濃度糖滲透壓逆境與 ABA 間之關係，相關結果如表 2。由數據顯示，高糖濃度培養 4 週的鱗片葉生長受到一定程度的抑制，與直接外加 ABA 結果相比較，鱗片葉雖然受到高濃度糖的抑制，但程度不如 ABA，依然有少數葉片發生，並未停止生長，F 及 L 於 4 週內仍分別約長出 3 及 1.5 片葉，CA 則不到

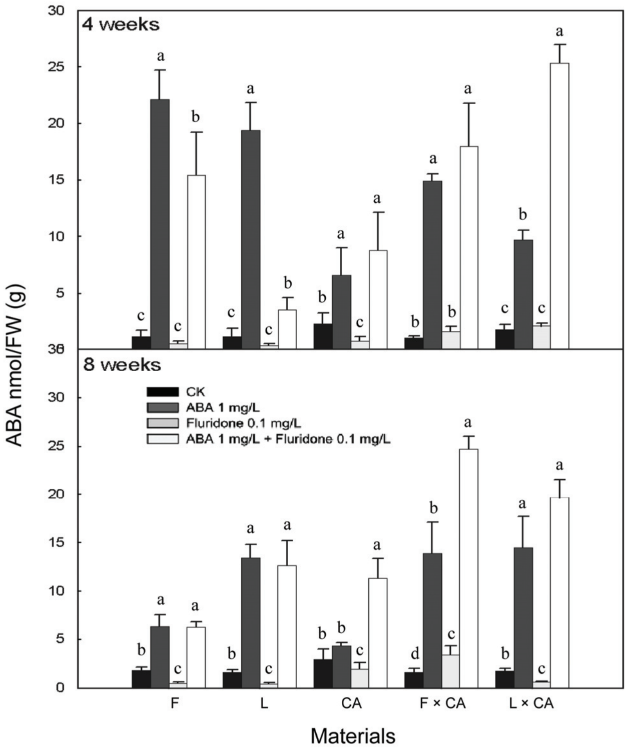


圖 1. ABA 及 Fluridone 處理對百合鱗片內生 ABA 濃度之影響。

Fig 1. The effect of ABA and Fluridone on the endogenous ABA concentration of *L. formosanum* (F), *L. longiflorum* (L), Casa Blanca (CA), and L/O (F × CA, L × CA) hybrid lilies. Values are the mean ± SE of five replicates. Means with the different letters for each line are not significantly different at 5% level by LSD test.

表 2. 糖及 Fluridone 處理對台灣百合 (F)、鐵炮百合 (L)、東方型百合 (CA) 及群間雜交種 (F × CA、L × CA) 鱗片葉生長之影響 (處理後 4 週及 8 週)

Table 2. The effect of Sucrose and Fluridone on the scale leaves number of *L. formosanum* (F), *L. longiflorum* (L), Casa Blanca (CA) and L/O (F × CA, L × CA) hybrid lilies at 4 and 8 weeks often treatment

		Scale leaf no.[z]				
Weeks	Treatment	F	L	CA	F × CA	L × CA
4	CK (MS medium)	4.67 ± 0.21 a	4.33 ± 0.21 a	0.50 ± 0.34 a	2.17 ± 0.31 a	0.75 ± 0.11 b
	A (ABA 1 mg/L)	0.33 ± 0.21 c	0.00 ± 0.00 d	0.00 ± 0.00 a	0.17 ± 0.17 c	0.42 ± 0.20 b
	S (sucrose 120g/L)	3.00 ± 0.86 b	1.50 ± 0.56 c	0.17 ± 0.17 a	1.00 ± 0.37 b	0.67 ± 0.21 b
	SF (S + F)	2.83 ± 0.17 b	3.33 ± 0.33 b	0.33 ± 0.21 a	1.83 ± 0.17 a	1.83 ± 0.54 a
8	CK (MS medium)	8.83 ± 0.31 a	8.17 ± 0.40 a	1.33 ± 0.42 a	4.33 ± 0.42 a	3.50 ± 0.22 a
	A (ABA 1 mg/L)	0.67 ± 0.21 c	0.50 ± 0.22 c	0.00 ± 0.00 b	0.58 ± 0.20 b	0.67 ± 0.21 b
	S (sucrose 120g/L)	5.33 ± 1.12 b	4.17 ± 0.70 b	0.33 ± 0.21 b	1.00 ± 0.37 b	0.67 ± 0.33 b
	SF (S + F)	5.17 ± 0.17 b	4.33 ± 0.33 b	1.33 ± 0.61 a	4.33 ± 0.61 a	2.67 ± 0.84 a

[z] Values are the mean ± SE of six replicates after 4 and 8 weeks culturing time. Means within columns for each post-treatment time followed by different letters are significantly different at 5% level by LSD test.

1 片葉的生長量，F × CA 及 L × CA 生長量介於兩親本間，CA 及 L × CA 在外加 ABA 與高濃度糖環境下之葉片生長並未有明顯差異。培養到 8 週，與對照組處理比較，高濃度糖依然對鱗片葉的生長造成抑制，葉片生長量數據顯示抑制效果並未因爲培養時間增加而降低。

高濃度糖同時再外加 Fluridone 培養 4 週後，與外加 ABA 或單獨高糖濃度比較，L、F × CA 及 L × CA 的葉片生長量有增加，F 反而有減少的趨勢，而 CA 則無明顯差異；處理培養 8 週後，F 及 L 並未有明顯差異，其餘則有明顯增加的葉片生長量，恢復到與對照組相同的生長勢 (表 2)。總結糖對鱗片葉形態發育影響的數據，結果顯示高濃度糖抑制鱗片葉的發生，但抑制效果不如外加 ABA，依然有一定程度的鱗片葉發生；高濃度糖同時外加 Fluridone 的栽培環境，對鱗片葉發生有促進的趨勢。

進一步分析處理高濃度糖的處理對鱗片內生 ABA 造成的影響，結果顯示高濃度糖處理有促使鱗片內生 ABA 濃度增加的趨勢 (圖 2)。除 L 及 CA 之外，與對照組比較，高糖濃度造成鱗片內生 ABA 的濃度明顯增加，L/O 雜交種增加幅度甚至超過外加 ABA 的處理組。高濃度糖外加 Fluridone 處理，相對於單獨高濃度糖處理，鱗片內生 ABA 濃度有下降的趨勢 (圖 2)。由高濃度糖處理的鱗片內生 ABA 濃度變化歸納結果顯示，高濃度糖的培養環境使鱗片內生 ABA 濃度有增加的趨勢，但幅度不及外加 ABA 處理；除 L/O 之外，外加 Fluridone 處理則會抵消此增加趨勢。

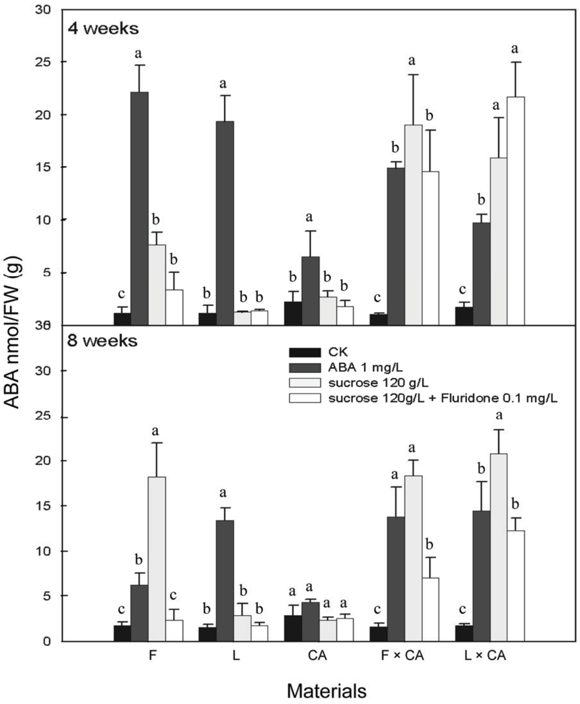


圖 2. 糖及 Fluridone 對鱗片內生 ABA 含量之影響。

Fig 2. The effect of Sucrose and Fluridone on the endogenous ABA concentration of *L. formosanum* (F), *L. longiflorum* (L), Casa Blanca (CA) and L/O (F × CA, L × CA) hybrid lilies. Values are the mean ± SE of five replicates. Means with the different letters for each line one not significantly different at 5% level by LSD test.

鱗片葉的生長調查數據顯示，鐵炮型百合 (F, L) 鱗片葉數發生最多，東方型百合 (CA) 呈現慢速生長，而 L/O 雜交種則呈現中間型表現。分析定量 ABA 濃度，顯示鐵炮型百合鱗片內生 ABA 濃度最低，Casa Blanca (CA) 最高，L/O 群間雜交種介於兩親本間。本實驗中另以 1 mg/L ABA 添加培養，所有供試基因型百合參試材料的鱗片葉生長均受到明顯抑制，呈現近乎停止狀態。百合培養基加入 ABA，再生株變成只有鱗片之形成，完全沒有鱗片葉之形成 (Kim *et al.* 1994)，百合鱗片葉的形成受到 ABA 的抑制 (Wu 2001; Chen 2003; Gerrits *et al.* 1992)。對照鱗片葉生長數據及鱗片內生 ABA 濃度分析結果，似乎可以推論 ABA 與百合鱗片葉的發生有一定程度的關聯性。ABA 在球根花卉中的研究，大多與種球休眠 (Matsubara & Kimura 1991; Kim *et al.* 1994; Suttle & Hultstrand 1994; Yamazaki *et al.* 1995; Yamazaki *et al.* 1999) 或種球發育 (Matsubara & Kimura 1991; Yamazaki *et al.* 1995; Kim *et al.* 2003) 等有關，較少研究與葉片形態發育之關係，ABA 與葉片形態發育之相關研究，大多與具有異形葉 (heterophylly) 的水生植物有關，因爲具有異形葉的水生植物葉形變化大而且極易觀察 (Goliber & Feldman 1989)。ABA 主要誘使水生植物沉水之條產生挺水葉，同時抑制沉水葉之發生 (Anderson Lars 1978; Deschamp & Cooke 1983; Goliber & Feldman 1989; Kane & Albert 1987; Mphan Ram & Rao 1982; Young *et al.* 1987)，同時也改變葉片構造及乾鮮重 (Young & Horton 1985)。Fluridone 主要透過抑制類胡蘿蔔素的合成途徑，進而抑制 ABA 的合成 (Suttle & Hultstrand 1994; Kim *et al.* 1994; Klicova *et al.* 2002; Hsu *et al.* 2003)，所以利用 Fluridone 來研究 ABA 所扮演的角色，本實驗利用組織培養，於試管內利用外加 Fluridone 進一步研究 ABA 與鱗片葉形態發生的相關性。與 ABA 反應相反，加入 Fluridone 0.1 mg/L 後，鱗片葉生長明顯受到促進 (表 1)，但有白化現象，Kim *et al.* (1994)、Wu (2001) 及 Chen (2003) 有相同研究結果。Shimasaki & Fukumoto (2000) 研究顯示 1 μM Fluridone 可以減少 80%的百合鱗片 ABA 合成，許多其它物種的研究也都有類似結論 (Harvey *et al.* 1994; Suttle & Hultstrand 1994; Yamazaki *et al.* 1999; Klicova *et al.* 2002; Hsu *et al.* 2003)。實驗中也觀察到隨著培養時間增加，在未繼代培養的情況下，白化現象會逐漸減少，顯示 Fluridone 的反應是可逆的，並未對葉綠素構造或葉綠素，類胡蘿蔔素的合成機制造成永久損害。Fluridone 培養油菜 (*Brassica napus*) 產生玻璃質化 (vitrification) 現象，經過一次不含 Fluridone 培養基繼代後，葉片重新有類胡蘿蔔素及葉綠素的合成而恢復正常 (Ragolsky & Thorpe 1989)。ABA 與 Fluridone 同時加入培養基，鱗片葉生長明顯再受到抑制 (表 1)，鱗片 ABA 濃度明顯增加 (圖 1)，顯示 Fluridone 只能抑制內生 ABA 的合成，無法抑制外加 ABA 所造成的反應，Shimasaki & Fukumoto (2000) 有相同研究結果。

培養基中加入高濃度 Sucrose (120 g/L) 造成滲透壓逆境 (Chen *et al.* 2001)，鱗片葉生長受到一定程度的抑制，與直接外加 ABA 結果相比較，顯示鱗片葉雖然受到高濃度糖的抑制，但程度不如 ABA，依然有少數葉片發生，並未停止生長 (表 2)，顯示除了滲透壓的影響之外，碳源的供應也影響葉片的生長。適當提供碳源有助於百合鱗片葉的生長，低濃度糖促進百合鱗片葉生長，高濃度則產生抑制效果 (Takayama & Misawa 1980; Aguettaz *et al.* 1990; De Klerk *et al.* 1992)。高濃度糖形成滲透壓逆境，植物遭遇水分逆境時，促使高濃度 ABA 合成 (Bianco-Trichant *et al.* 1993; Cummins 1973; Gomes *et al.* 2003; Milborrow & Robinson

1973; Pospíšilová *et al.* 2000; Quarrie & Jones 1977; Yamazaki *et al.* 1995)。高濃度糖的處理促使鱗片內生 ABA 濃度增加 (圖 2)，因此高濃度糖環境下，百合鱗片葉的生長抑制與 ABA 有關聯性。但 F 及 L 並未因高濃度糖的培養環境而使鱗片內生 ABA 濃度出現明顯變化，似乎鐵炮型百合因爲生長快速，對於碳源的需求較大，因此對糖濃度的變化有較大的緩衝。不同培植體或發育時期對於碳源需求不同，造成對糖濃度的變化有不同的耐受力，也因此影響 ABA 的作用 (Barthe & Bulard 1982; Garciarrubio *et al.* 1997)。

引用文獻 (Literature cited)

Aguettaz, P., A. Paffen, I. Delvallee, P. Van Der Linde, and G. J. De Klerk. 1990. The development of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* generated *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 22:167–172.

Anderson Lars, W. J. 1978. Abscisic acid induces formation of floating leaves in heteropohyllous aquatic angiosperm *Potamogeton nodosus.* Science 201: 1135–1138.

Barthe, P. H. and C. Bulard. 1982. Influence of agar and sucrose on the behavior of dormant apple embryos cultured *in vitro*. New Phytol. 91:517–529.

Bianco-Trichant, J., J. M. Guigonis, and M. T. Le Page-Degivay. 1993. Early release of ABA from cell walls during rose petal protoplast isolation. J. Exp. Bot. 44:957–962.

Chen, C. T., L. M. Chen, C. C. Lin, and C. H. Kao. 2001. Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper. Plant Sci. 160: 283–290.

Chen, S. M. 2003. Effects of Exogenous Abscisic Acid, Osmotica and Fluridone on Developmental Pattern of Lily Leaves (*Lilium spp.*) Cultured *in Vitro*. Master Dissertation, Graduate Institute of Horticulture National Taiwan University. 70 pp.

Cummins, W. R. 1973. The metabolism of abscisic acid in relation to its reversible action on stomata in leaves of *Hordeum vulgare* L. Planta 114:159–167.

De Klerk, G. J., K. S. Kim, M. Van Schadewijk, and M. Gerrits. 1992. Growth of bulblets of *Lilium speciosum in vitro* and in soil. Acta Hort. 325:513–520.

Deschamp, P. A. and T. J. Cooke. 1983. Leaf dimorphism in aquatic angiosperms: Significance of turgor pressure and cell expansion. Science 219:505–507.

Garciarrubio, A., J. P. Legaria, and A. A. Covarrubias. 1997. Abscisic acid inhibits germination of mature *Arabidopsis* seeds by limiting the availability of energy and nutrients. Planta 203:182–187.

Gerrits, M. M., K. S. Kim, and G. J. De Klerk. 1992. Hormonal control of dormancy in bulblets of *Lilium speciosum* cultured *in vitro*. Acta Hort. 325:521–527.

Goliber, T. E. and L. J. Feldman. 1989. Osmotic stress, endogenous abscisic acid and the control of leaf morphology in *Hippuris vulgaris* L. Plant Cell Environ. 12:163–171.

Gomes, M. M. A., A. M. M. A. Lagôa, E. C. Machado, and C. L. Medina. 2003. Abscisic acid and indole-3-acetic acid contents in orange trees infected by *Xylella fastidiosa* and submitted to cycles of water stress. Plant Growth Regul. 39:263–270.

Harvey, B. M. R., G. Bowden, C. Reavey, and C. Selby. 1994. Stimulation of *in vitro* root and shoot growth of potato by increasing sucrose concentration in the presence of fluridone, an inhibitor of abscisic acid synthesis. Plant Cell Tissue Organ Cult. 37:271–276.

Hsu, S. Y., Y. T. Hsu, and C. H. Kao. 2003. Ammonium ion, ethylene, and abscisic acid in polyethylene glycol-treated rice leaves. Biol. Plant. 46:239–242.

Jin, S. W. 1995. Genetic Variability, Conservation and Utilization of *Lilium* Germplasm. Ph. D. Dissertation, Graduate Institute of Horticulture National Taiwan University. 145 pp.

Kane, M. E. and L. S. Albert. 1987. Abscisic acid induces aerial leaf morphology and vasculature in submerged *Hippuris Vulgaris* L. Aquatic Bot. 28:81–88.

Kim, E. K., E. J. Hahn, H. N. Murthy, and K. Y. Pack. 2003. High frequency of shoot multiplication and bulblet formation of garlic in liquid cultures. Plant Cell Tissue Organ Cult. 73:231–236.

Kim, K. S., E. Davelaar, and G. J. De Klerk. 1994. Abscisic acid controls dormancy development and bulb formation in lily plantlets regenerated *in vitro*. Physiol. Plant. 90:59–64.

Klicova, S., J. Sebanek, M. Hudeova, H. Vitkova, and H. Vlasinova. 2002. The effect of fluridone and flurochloridone on the incidence of albinism in pea (*Pisum sativum*) and on the abscission of leaves of privet *(Ligustrum vulgare*). Rostlinná Výroba 48: 255–260.

Matsubara, S. and I. Kimura. 1991. Changes of ABA content during bulbing and dormancy and *in vitro* bulbing in onion plant. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 59:757–762.

McLellan, T. 1990. Development of differences in leaf shape in *Begonia dregei* (*Begoniaceae*). Am. J. Bot. 77: 323–327.

Milborrow, B. V. and D. R. Robinson. 1973. Factors affecting the biosynthesis of abscisic acid. J. Exp. Bot. 24: 537–548.

Mphan Ram, H. Y. and S. Rao. 1982. *In vitro* induction of aerial leaves and of precocious flowering in submerged shoots of *Limnophila indica* by abscisic acid. Planta 155:521–523.

Poethig, R. S. 1997. Leaf morphogenesis in flowering plants. The Plant Cell. 9:1077–1087.

Pospíšilová, J., D. Haisel, H. Synková, J. Čatský, N. Wilhelmová, S. Plzáková, D. Procházková, and F. Šrámek. 2000. Photosynthesis pigment and gas exchange during *ex vitro* acclimation of tobacco plants as affected by CO_2 supply and abscisic acid. Plant Cell Tissue Organ Cult. 61:125–133.

Quarrie, S. A. and H. G. Jones. 1977. Effects of abscisic acid and water stress on development and morphology of wheat. J. Exp. Bot. 28:192–203.

Ragolsky, E. and T. A. Thorpe. 1989. Physiological effects of fluridone on shoot cultures of *Brassica napus* L. and *Beta vulgaris* L. J. Plant Physiol. 134:613–618.

Shimasaki, K. and Y. Fukumoto. 2000. *In vitro* bulbing in *Lilium* × *Formolongi* hort seedlings. Acta Hort. 520: 61–65.

Smith, L. G. and S. Hake. 1992. The initiation and determination of leaves. The Plant Cell 4:1017–1027.

Suttle, J. C. and J. F. Hultstrand. 1994. Role of endogenous abscisic acid in potato microtuber dormancy. Plant Physiol. 105:891–896.

Takayama, S. and M. Misawa. 1980. Differentiation in *Lilium* bulbscales grown *in vitro*. Effects of activated charcoal, physiological age of bulbs and sucrose concentration on differentiation and scale leaf formation *in vitro*. Physiol. Plant. 48:121–125.

Walker-Simmons, M. 1987. ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistant and susceptible cultivars. Plant Physiol. 84:61–66.

Wu, S. H. 2001. Effects of Genotypes, Osmoticums, ABA and Fluridone on Leaf Development Pattern of Lilies Cultured *in vitro*. Master Dissertation, Graduate Institute of Horticulture National Taiwan University. 72 pp.

Yamazaki, H., T. Nishijima, and M. Koshioka. 1995. Changes in abscisic acid content and water status in bulbs of *Allium wakegi* Araki throughout the year. J. Jpn. Soc. Hort. Sci. 64:589–598.

Yamazaki, H., T. Nishihima, Y. Yamato, K. Koshioka, and H. Miura. 1999. Involvement of abscisic acid (ABA) in bulb dormancy of *Allium wakegi* Araki I. Endogenous levels of ABA in relation to bulb dormancy and effects of exogenous ABA and Fluridone. Plant Growth Regul. 29:189–194.

Young, J. P. and R. F. Horton. 1985. Heterophylly in *Ranunculus flabellaris* Raf: The effect of abscisic acid. Ann. Bot. 55:899–902.

Young, J. P., N. G. Dengler, and R. F. Horton. 1987. Heterophylly in *Ranunculus flabellaris*: The effect of abscisic acid on leaf anatomy. Ann. Bot. 60:117–125.

The Effects of ABA, Fluridone and Sucrose on the Scale Leaves Morphogenesis of Longiflorum Type and Intra-hybrid Lilies [1]

Ting-En Dai [1,4] and Chou-Tou Shii [2]

Abstract

Dai, T. E. and C. T. Shii. 2009. The effects of ABA, Fluridone and sucrose on the scale leaves morphogenesis of longiflorum and intra-hybrid lilies. J. Taiwan Agric. Res. 58:234–242.

To investigate the effects of exogenous ABA on the development of scale leaf, four different clones of *L. formosanum* (F), *L. longiflorum* (L), oriental hybrid 'Casa Blanca' and related distant hybrids (F × CA, L × CA) were *in vitro* cultured under different ABA, Fluridone and sugar concentration. Four and eight weeks after culture, it showed that the growth of scale leaves among all genotypes were promoted by ABA but inhibited by Fluridone, ABA can diminish the effects of Fluridone, and Fluridone treatment increases the number of scale leaves but somewhere bleaching in leaf blade. In applied ABA or Fluridone, L/O hybrids showed intermediate performance as compared with F and L populations. Four weeks after culture, un supplement both ABA and Fluridone, L/O hybrids had better scale leaf growth than their parents. Based on the analysis of ABA concentration, it showed that the endogenous of ABA concentration was the highest in CA, lowest in F and L, and L/O hybrids were intermediate, exogenous ABA stimulates endogenous ABA synthesize in the scale, Fluridone inhibits endogenous ABA concentration in the scale, and exogenous ABA can diminished the effects of Fluridone. The effects of sucrose on the scale leaf morphogenesis showed that higher sucrose concentration inhibits the development of scale leaves. However, this effect of inhibition was less than exogenous ABA, since scale leaf emergence was still observed in sucrose treatment. In additionally, high concentration sucrose combined with Fluridone can promote the scale leaf development. Whatever supplement Fluridone or not in the medium, the effects of high concentration sucrose showed no significant change on endogenous ABA in scale of F, L and CA but increase in L/O hybrids.

Key words: Lily, ABA, Fluridone, Sucrose, Scale leaf.

---

1. Contribution No.2368 from Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture. Accepted: September 9, 2009.
2. Associate Researcher and Chairman, Floriculture Research Center, TARI, Gukeng, Yulin, Taiwan, ROC.
3. Professor, Depatrtment of Horticulture, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, ROC.
4. Corresponding author, e-mail: tedai@tari.gov.tw; Fax: (05)5820834.

「台灣農業研究」稿約

一、 本刊為行政院農業委員會農業試驗所發行之學術性季刊，刊登農業試驗研究相關之研究稿件：

論　　說：由本所邀請專家撰寫。

研究報告：關於農業科學未曾發表之研究報告，按題目、作者、摘要、前言、材料與方法、結果、討論、結論 (一般略去)、誌謝 (可略去)、引用文獻等依序撰寫，圖與表附於其後，全文以不超過 10 印刷頁為原則。

研究簡報：關於農業科學未曾發表之簡短原始研究報告，不須分章節撰寫，但須附中英文摘要，全文以不超過 4 印刷頁為原則。

二、稿件應以中文或英文撰寫。來稿請送原稿及電子檔案各一份 (內各附照片原圖，繪製圖版可附原圖與影印圖片二份)。文稿以 A4 大小之白色紙張 (長 29.6 公分，寬 21 公分) 兩倍行高 (double space) 打字，12 號字體，左邊對齊，版面應上下預留 3 公分，左右 2 公分之空間，並自第二頁起在右下角以阿拉伯數字註明頁數。撰寫時，中文以細明體、英文以 Times New Roman 字體打字；英文字距一格，句距二格。審查接受之稿件，隨文請附紙本文稿一份與電子檔案，以利送審及電腦排版等作業。

三、稿件格式：

題　目：宜簡短，能充分反應文旨，並附簡題 (Running title) (中文 12 字；英文 6 字以內為原則)。英文題目除介系詞、連接詞等字外，每字第一字母應大寫。題目附小註，說明研究報告編號。

作　者：作者姓名置中，中文名字間空一格；英文姓名則名在前姓氏在後，作者二人或二人以上時，以 “，” 相隔，最後一人前加 “and” 字樣，其表示方法如 Chen-Seng Huang, Chen-Chang Chen, and Chyr-Guan Chen。每一作者須附小註，以說明所屬機關單位，通訊作者須附電子郵件信箱與傳真機號碼。題目與作者同置第一頁。

摘　要：不分段落、宜簡潔明確。摘要之前應加作者、年代、題目、期刊、及卷期，摘要之後應附關鍵詞 (Key words)，關鍵詞不超過 5 個，每個英文關鍵詞第一字母應大寫。摘要以不超過 500 字為原則。以中 (英) 文發表者須附英 (中) 文摘要，置於本文之後，且內容須與中 (英) 文摘要相符，並附稿件編號、作者、通訊作者之小註。

本　文：依序為前言 (INTRODUCTION)、材料與方法 (MATERIALS AND METHODS)、結果 (RESULTS)、討論 (DISCUSSION)、結論 (CONCLUSION)、誌謝 (ACKNOWLEDGEMENTS)、引用文獻 (LITERATURE CITED)。除學名、專有名詞、化學式、數學公式、數字、度量衡單位及縮寫外，文句中不得中外文並用，需使用英 (外) 文以助明瞭時，須將英 (外) 文括號置於中文之後。材料與方法、結果兩部份如有必要須分章節，每一章節內並可再分小章節，以助明瞭文稿內容。章節題目 (heading) 單行置於該章節之前，小章節題目 (subheading) 直接置於小章節之首。

表　格：

1、每一表格應分別繕製，須以 WORD®中 “表格” 工具製作，上方須有標題，並按文中出現順序加上表 **1. (Table 1.)**，表 **2. (Table 2.)** 等冠號。

2、中文稿之表格標題應中英文並列，冠號與表幅齊頭，表內項目及內容以英文書寫。英文標題及各欄英文細目，除第一字之第一字母大寫外，餘均小寫。

3、表格應加分析、簡化與歸納後始可列表。每一表格應在文中標示清楚，以便對照。

4、表中內容如需說明，均須附加小註，以 z, y, x,…等縮小小寫字母置於右上角，並於表下依次敘述。表格僅列橫線。

5、性質類同之圖與表，務請精簡與合併。

圖　　片：

1、手繪圖版以黑色墨水分別繪圖紙或描繪紙（白色透明紙）上。如以電腦繪圖，請以鐳射印表機或同規格之印表機列印，力求清晰。

2、圖中所有標示應以英文書寫（Arial 字型）或註明於標題之後。

3、照片以光面紙為原則，清晰度以縮小 50%可判讀為宜。多幅照片儘量製成併版；如有特別指明，應加圈或箭頭表明。顯微照相，應加比例尺大小；照片大小以不超過版面（25 cm × 18 cm）為宜。

4、圖版及照片下方應有標題，並按文中出現的順序加上圖 **1. (Fig. 1.)**、圖 **2. (Fig. 2.)** 等冠號，在文中須標示清楚，以便對照。中文稿標題應中英文併列，力求明確。

5、除併圖外，每一圖片應單頁製作。

6、照片、圖片背面應註上冠號及作者姓名，以免排印錯誤。

誌　　謝：不分段落，包括人物、經費來源等。誌謝可略去。

引用文獻：

1、列舉確實曾引用之文獻。文獻以登載於學術性期刊、書籍、研討會之文章及學位論文為限。文中涉及引用文獻時，根據該文獻的作者與年代加以括號：如（Sung 1991）、(Lo 1991, 1992)、(Chen & Ho 1983)、(Sung 1991; Hsu *et al.* 1992)，以年代先後為序置於引用文處。

2、文獻須以英文撰寫，以姓名字母為序。作者相同時以年代先後為序。

3、文獻之書寫方法以期刊為例，依序為作者、年代、題目、期刊、卷期、頁數。

4、期刊名須依該期刊公告之縮寫撰寫；如無者，請參照 Biosciences Information Service (1992) 出版之 "Serial Sources for the BIOSIS Previews Database"或依該學術領域之慣例撰寫。

5、文獻書寫範例如下：

(1) 原中文報告引用文獻出自學術性期刊

Hsu, S. H., T. Y. Chung, T. C. Kuo, and S. F. Wang. 1992. Studies on the micro-climate of greenhouse. I. Light environment of greenhouse. J. Agric. China 157:34–43. (in Chinese with English abstract)

(2) 原中文報告引用文獻出自著作性書籍

Sung, J. M. 1991. Nitrogen metabolism of rice. Chinese Agronomy Press. Taipei. 100 pp. (in Chinese)

(3) 原中文報告引用文獻出自編輯性書籍

Yang, C. M. and C. Y. Lin. 2003. Studies on rice precision farming system. p.1–12. *in*: Rice Precision Farming System. (Yang, C. M. and C. Y. Lin, eds.) Agric. Res. Inst. Pub. No. 105. Taichung. 252 pp. (in Chinese with English abstract)

(4) 原中文報告引用文獻出自研討會專刊

Chang C. A. 2001. Application and extension of virus-free seedling for the control of virus diseases of passionfruit in Taiwan. p.31–38. *in* the Proceeding of Symposium on Application of Healthy Plant for Control of Plant Diseases. Taiwan Phytopathol. Soc. Pub. Taichung. (in Chinese with English abstract)

四、單位、縮寫格式、括號及統計分析

1、凡文中出現之數值，除非另有特別之意義，一律用阿拉伯數字書寫。單位如以英文表示，則用國際公認標準符號（SI units）代替全文，各常用之縮寫單位參照說明如下：

(1)長度：公里（km）、公尺（m）、公分（=厘米）(cm)、公釐（=毫米）(mm)、微米（μm）。

(2)重量 (W)：公斤 (kg)、公克 (g)、毫克 (mg)、μg。
(3)容積 (V)：公升 (L)、公撮 (=毫升) (mL)、μL。
(4)面積：公頃 (ha)、平方公尺 (m^2)、平方公分 (cm^2)。
(5)溫度：攝氏 (℃)、絕對溫度 (K，但須加以說明)。
(6)時間：日 (天) (d)、時 (h)、分 (min)、秒 (s)。
(7)濃度：莫耳 (M)、千分之一莫耳 (mM)、當量 (N)、千分之一當量 (mN)。
(8)重力加速度：*g*。

2、其他之縮寫：平均 (*av*)、大約 (*ca*)、直徑 (diam.)。
3、括號：括號字型全以半形 ( )，括號前後各空一格。
4、統計分析：達顯著性水準以*、**或處理間顯著差異區分，以 a、b、c、…表示者均應加註顯著機率值 P (例如 $P < 0.01$)；各統計量請採慣用符號，例如相關係數 (r) 、決定係數 (R^2)、變異係數 (cv)、標準差 (sd)、平均值標準差 (se) 等。
5、其他問題：
(1)單位與其前面數值之間應空一格，如 220 g。
(2)數學運算符號與其前後數值之間應各空一格，如 P = 0.014、23.6 ± 3.0、15 × 2。
(3)在±、×或 to 的前後兩數值若是含有單位，請用 23.6% ± 3.0%、15 cm × 2 cm、20℃ to 30℃ (即勿省略前面數值之單位)。
(4)數值起迄符號用– (全型破折號)，勿用~或-，且與前後兩數值之間無須留空格，如 3–6、2005–2007 年、7 月 20–25 日。
(5)年代一律用西元。

五、其他注意事項
1. 生物學名以斜體字表示，屬名第一字母大寫。學名於摘要、本文、每一圖表中第一次出現時，須寫全名，如 *Citrus sinensis*；第二次出現時，屬名保留第一字母後加句點 “.”，種名全寫，如 *C. sinensis*。生物學名於本文中首次出現時應加註命名者。
2. 中文稿件中，外文名詞應儘量翻譯成中文，若是不常見名詞應於文中第一次出現時以括號標出原文。摘要及本文中，英文縮寫於第一次出現時，須附全名。

六、投稿方式
1. 稿件內容務須依照上列規定格式書寫，本期刊編輯委員保有修改與退稿之權利。文稿經本期刊接受後，作者得送含文稿內容之磁片或電子檔案 (IBM 相容電腦之文書管理檔，如 Word 檔或其他) ，並由作者負責前二校。除筆誤與錯字外，作者在校稿時，不得擅自更改內容與數據。
2.審稿程序請上網參閱本期刊「論文審查制度流程」，網址：http://www.tari.gov.tw/。

七、文稿必須是作者本身的著作，且作者為唯一的著作權擁有者，否則因此引發之法律責任將由作者負責。投稿應為未經刊登之文章，亦不得一稿多投。投稿需經所有作者同意。稿件經本期刊接受後，投稿人需繳交「著作權讓與書」，如未提供者，本期刊不予刊登。著作財產權屬農試所所有，非經本所書面同意，不得轉載或移轉他處發表。本期刊有權對文稿進行必要之詞句修改。

八、來稿經編審委員會審查合格後刊登，由本刊印贈抽印本 50 本；彩色頁印刷及抽印本加印費用由投稿人自行負擔。

九、其他未盡事宜本期刊得隨時修正或補充。

台灣農業研究

(原中華農業研究)

第五十八卷 第三期

中華民國九十八年九月出版

發 行 人:劉 大 江
總 編 輯:呂 秀 英
主　　 編:吳 宜 晏 陳 盈 佑
編審委員:
生 技 組:吳 明 哲(主審)
作 物 組:歐 錫 坤(主審)
黃 肇 家 楊 純 明 施 昭 彰
農 化 組:郭 鴻 裕(主審)
簡 宣 裕 劉 滄 棽
植 病 組:安 寶 貞(主審)
鄧 汀 欽
應 動 組:王 清 玲(主審)
陳 健 忠
農 工 組:蔡 致 榮(主審)
黃 禮 棟
種 原 組:黃 勝 忠(主審)
農 經 組:張 采 蘋(主審)
花卉中心:謝 廷 芳(主審)
嘉義分所:蔡 武 雄(主審)
徐 信 次 楊 宏 仁
鳳山分所:陳 甘 澍(主審)
溫 宏 治

另聘請各大學院校及研究機關相關學者專家擔任審查委員

Vol. 58, No. 3 September, 2009

JOURNAL
OF
TAIWAN AGRICULTURAL RESEARCH
(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

PUBLISHER: Liu, Dah-Jiang

EDITOR IN CHIEF: Lu, Hsiu-Ying

EDITORS:

Wu, Yi-Yan Chen, Ying-You

EDITORIAL BOARD:

Ann, Pao-Jen (Plant Pathology)
Chen, Kan-Shu (Tropical Horticulture)
Hsieh, Ting-Feng (Floriculture)
Ou, Shyi-Kuan (Crop Science)
Tsai, Wu-Hsiung (Subtropical Agriculture)
Wu, Min-Tze (Biotechnology)
Chang, Tsai-Ping (Agriculture Economics)
Guo, Horng-Yuh (Agriculture Chemistry)
Huang, Sheng-Chung (Crop Genetic Resources)
Tsai, Jyh-Rong (Agriculture Engineering)
Wang, Chin-Ling (Applied Zoology)

EDITORIAL ADVISORY BOARD:

Chen, Chien-Chung	Chien, Shiuah-Yuh	Deng, Ting-Chin
Hsu, Hsin-Tszu	Huang, Chao-Chia	Huang, Li-Duhng
Liu, Tsang-Sen	Shih, Jau-Chang	Tsai, Wu-Hsiung
Wen, Hung-Chich	Yang, Chwen-Ming	Yang, Hong-Ren

Reviewers of the related fields are also invited from universities and other research organizations.

台灣農業研究第五十八卷第三期

出 版 者：行政院農業委員會農業試驗所

發 行 人：劉大江

總 編 輯：呂秀英

地　　址：41362台中縣霧峰鄉萬豐村中正路189號

網　　址：http://www.tari.gov.tw

電　　話：(04)23302301

出版日期：中華民國九十八年九月三十日

定　　價：新臺幣一七五元

展 售 處：五南文化廣場　400台中市中山路6號 (04)22260330

國家書店松江門市　104台北市松江路209號1樓 (02)25180207

國家網路書店　http://www.govbooks.com.tw

承 印 者：學安文化事業有限公司

電　　話：(04)22861600

ISSN 0022-4847

GPN 2009500560

September, 2009

Journal of Taiwan Agricultural Research

(Formerly Journal of Agricultural Research of China)

Vol. 58, No. 3

Research Reports

Synonymous Condon Usage Bias in Rice Genes with Resistance to Bacterial Blight (*Xanthomonas oryza*)

Meng-Li Wei, Yi-Han Chung, Chun-Tang Lu, and Hsiu-Ying Lu 155

Certification of Organic Vegetable by Analyzing the Nitrogen Isotope Composition of Plant: a Preliminary Evaluation

Tsang-Sen Liu, Tsung-Ren Peng, Sheng-Hong Wu, Chia-Hua Fan, and Yu-Wen Lin 169

Propagation, Inoculation and Preservation of *Podosphaera xanthii* Caused Muskmelon Powdery Mildew

Jin-Hsing Huang, Chun-Wei Chen, and Junn-Feng Su 176

Control of Phytophthora Late Blight of Potato and Tomato with Neutralized Phosphorous Acid

Jyh-Nong Tsai, Pao-Jen Ann, Ien-Tien Wang, Shin-Yuan Wang, and Chyung-Yue Hu 185

Isolation and Identification of *Pepper Veinal Mottle Virus* on Lisianthus

Ying-Huey Cheng, Chin-Chih Chen, Jye-Yann Liao, Ting-Chin Deng, and Chin-An Chang 196

A New Variety of Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) 'Tainung No.3 Rose Red'

Jer-Way Chang, Chung-Ruey Yen, Hsin-Tszu Hsu, Wan-Ling Wang, Wu-Hsiung Tsai, Yung-Hsiung Cheng, and Chao-Chi Ho 208

Construction of Introgression Lines from Wild Rice (*Oryza australiensis* Domin) and Assessment of Yield-Related Traits

Charng-Pei Li, Hsin-Mei Ku, Tzer-Kuan Hu, Chyr-Guan Chern, Ming-Hsing Lai, Ching-Shan Tseng, Jen-Ren Chen, and Tung-Hi Tseng 219

Research Note

The Effects of ABA, Fluridone and Sucrose on the Scale Leaves Morphogenesis of Longiflorum Type and Intra-hybrid Lilies

Ting-En Dai and Chou-Tou Shii 234

Published by Taiwan Agricultural Research Institute,
Council of Agriculture Taichung, Taiwan, Republic of China

行政院新聞局出版事業登記證局版臺省誌字第二九八號　中華郵政中臺字第○三○九登記為雜誌交寄

ISSN 0022-4847

9 770022 484003

GPN 2009500560

定價：新台幣一七五元